Aus dem Institut für Toxikologie und Embryopharmakologie
Direktor: Professor Dr. med. Diether Neubert

Die Expression des ß-Nervenwachstumsfaktor-rezeptors während der Ontogenese. Lokalisation und zeitlicher Verlauf im Hühnerembryo.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Gennadij Rajwich
aus Leningrad

1985

Aus dem Institut für Toxikologie und Embryopharmakologie
Direktor:Professor Dr.med.Diether Neubert

Die Expression des ß-Nervenwachstumsfaktorrezeptors während der Ontogenese.Lokalisation und zeitlicher Verlauf im Hühnerembryo.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Gennadij Rajwich
aus Leningrad

Referent: Prof. Dr. med. H.-J. Merker
Korreferent: Prof. Dr. med. M. Vogel

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert: 14.10.1985

Herrn Prof. Dr. H.-J. Merker danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die sehr freundliche Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.
Fernker danke ich der Arbeitsgruppe um Dr. Astrid Zimmermann und Dr. Arne Sutter für die großzügige Überlassung von Nervenwachstumsfaktor und der in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper sowie für ihre lebhafte Anteilnahme an dem Fortgang dieser Abhandlung.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549615_0055

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung..... 1
Material und Methoden..... 4
Ergebnisse:
Der Nachweis der ß-NGF-Rezeptoren in sensorischen, sympathischen und parasympathischen Ganglien und in Nerven..... 6
Expression der ß-NGF-Rezeptoren im Muskelgewebe..... 10
Expression der ß-NGF-Rezeptoren in den Sinnesorganen..... 10
Expression der ß-NGF-Rezeptoren im Rückenmark und Hirnstamm..... 11
Tabellarische Zusammenfassung der NGF-Rezeptorexpression während der Entwicklung..... 13
Diskussion..... 14
Zusammenfassung..... 27
Literaturverzeichnis..... 29
Bildanhang..... 36

E I N L E I T U N G

Ein bedeutsamer Aspekt der neuronalen Reifung und Differenzierung ist die Art und Weise der neuronalen Selektion während der Ontogenese. Von den während der Embryonalzeit aus dem Neuroektoderm entstehenden Nervenzellen, den Neuroblasten, entwickelt sich nur ein Teil zu Neuronen im adulten Organismus. Zuerst von Collin 1906 beschrieben, ist es bekannt, daß ein erheblicher Teil der Neuroblasten während der frühen Entwicklung zugrundegeht. Dieses natürlich auftretende und zeitlich limitierte Zellsterben scheint ein allgemeines Prinzip bei dem Aufbau des Nervensystems der Wirbeltiere zu sein (Cowan, 1973; Hughes and McMillan-Carr, 1978; Oppenheim, 1984).

Die neuronale Degeneration während der frühen Embryonalentwicklung wird auf zweifache Art reguliert. Sowohl die Größe des peripheren Innervationsfeldes, als auch die synaptische Aktivität der innervierenden Neurone bestimmen das Ausmaß der natürlich auftretenden selektiven Degeneration. So führt die Vergrößerung des peripheren Innervationsfeldes, z.B. bei den Vorderhornmotoneuronen durch Implantation einer zusätzlichen Extremität, zu einem vermehrten Anteil der überlebenden Neurone (Hollyday and Hamburger, 1976). Ähnliche Verminderung der Degeneration bewirkt auch die Hemmung der synaptischen Übertragung an der motorischen Endplatte, sowohl durch stabilisierende (Curare) wie depolarisierende (Suxamethonium) Muskelrelaxantien (Pittman and Oppenheim, 1979; Boydston and Sohal, 1980). Die artifiziell zusätzlich am Leben erhaltene Motoneurone haben nach Absetzen der Muskel-relaxantien im geschlüpften Hühnchen eine anscheinend normale Lebensdauer und sind voll funktionsfähig (Oppenheim, 1984).

Das Phänomen des neuronalen Zellsterbens ist allerdings nicht immer nur auf die Embryogenese beschränkt. Einige der bekanntesten Krankheitsbilder in der Psychiatrie und Neurologie sind durch spezifische Degeneration einzelner Neuronengruppen charakterisiert. So gehen bei Morbus Parkinson die dopaminergen Neurone in der Substantia nigra zugrunde (Birkmayer and Hornykiewicz, 1976), bei der senilen Demenz vom Alzheimer-Typ die cholinergen Neurone des Meynertschen Kerngebietes (Terry and Davies, 1980), bei Chorea Huntington degeneriert das GABA-erge System des Striatums (Perry TL et al. 1973) und die peripheren und zentralen Motoneurone bei der Amyotrophen Lateralsklerose. Schon diese verkürzte Darstellung der in der Klinik vorkommenden Erkrankungen zeigt, daß die Erforschung der in der

Ontogenese auftetenden neuronalen Degeneration nicht ohne klinische Relevanz ist.Es wird vielmehr erwartet,daß die Aufschlüßelung der in der Embryogenese stattfindenden Prozeße auch die Pathogenese der neurodegenerativen Erkrankungen erhellen wird.

Ein wichtiger Schritt in der Erforschung der das neuronale Überleben steuernden,neurotrophen Faktoren war die Entdeckung des Nervenwachstumsfaktors (Bueker,1948;Levi-Montalcini and Hamburger,1951).Glücklicherweise ist der Nervenwachstumsfaktor (Nerve Growth Factor,ß-NGF) in verschiedenen Körpersekreten bestimmter Wirbeltiere in hohen Konzentrationen enthalten, so z.B. im Speichelsekret einiger Nagetiere wie Maus und Mastomys natalensis (Wallace and Partlow 1976;Burton et al.,1978),in der Samenflüßigkeit von Meerschweinchen und Rind (Harper et al.,1979;Harper et al.,1982)und im Schlangengift,z.B.Cobra venom (Hogue-Angeletti et al. ,1976),wodurch die Aufreinigung erheblich vereinfacht wurde.Der Nervenwachstumsfaktor konnte deshalb schon 1960 rein dargestellt werden (Cohen ,1960) und ist bis jetzt der einzige neurotrophe Faktor,dessen Proteinstruktur aufgeklärt ist (Angeletti and Bradshaw,1971).Sensorische und sympathische Neurone sind die klassischen Ziele dieses gut charakterisierten Proteins (Levi-Montalcini and Angeletti,1968).Vor allem wegen seiner chemischen Reinheit ist ß-NGF bis heute einzigartig in seinem Modellcharakter für das molekularbiologische Studium der neurotrophen Faktoren.

Die Auswirkungen des ß-NGF-Mangels in vivo fielen schon relativ früh auf,als nachgewiesen werden konnte,daß die Injektion oder Induktion von anti-ß-NGF-Antikörpern in Maus (Levi-Montalcini and Angeletti,1968),Ratte (Zaimis et al.,1965;Aloe and Levi-Montalcini,1979) und Meerschweinchen (Johnson et al.,1983) zur Degeneration der sympathischen und sensorischen Neurone führten.Wenn der Nervenwachstumsfaktor während des Zeitabschnitts der in sympathischen und sensorischen Ganglien natürlich auftretender Zelldegeneration verabreicht wurde,wurden Neurone,die sonst untergegangen wären,am Leben erhalten (Levi-Montalcini and Angeletti,1968;Hamburger et al.,1981).

Diese in vivo Experimente haben deutlich die Notwendigkeit des ß-NGFs für das Überleben und die Trophik dieser Neurone demonstriert. Eine Reihe späterer in vitro Experimente zeigte,daß die Überlebenswirkung direkt ist und durch Bindung des ß-NGFs an den hochaffinen Rezeptor in der Zelloberfächenmembran der ansprechbaren Neurone vermittelt wird (Frazier et

al.1973;Sutter et al.,1979).Durch in vitro Experimente konnten die pleiotrophen Effekte des ß-NGFs - die Neuritenaussproßung,die Überlebenswirkung (survival effect),die Induktion der Neurotransmittersynthese - im Detail analysiert werden.In vitro-Systeme erbrachten aber auch den Nachweis,daß nicht nur periphere Neurone,sondern auch periphere Gliazellen spezifische ß-NGF Bindungsstellen während der frühen Neuron-Glia-Interaktion exprimieren (Zimmermann and Sutter,1983;Rohrer and Sommer,1983).
ß-NGF-Rezeptoren wurden während der Embryonalentwicklung des Gehirns nachgewiesen (Szutowicz et al.,1976) und in vivo und in vitro Studien haben gezeigt,daß ß-NGF die Spiegel der Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT), und damit die Intensität der cholinergen Innervation des Cortex Cerebri beeinflußt (Gnahn et al.,1983;Hefti,1983).
ß-NGF scheint weiter auf periphere,parasympathische Neurone (Collins and Dowson,1983)und sogar auf Mastzellen zu wirken (Bruni et al.,1982).
Es wurde bisher noch nicht demonstriert,daß diese neuen,potentiellen Ziele der NGF-Wirkung im Rahmen ihres Überlebens auf NGF angewiesen sind.Stattdessen scheint NGF oder ein NGF-ähnlicher Faktor bestimmte Differenzierungseigenschaften dieser Zellen zu beeinflußen.
Um die Liste der ß-NGF-abhängigen Zielorgane zu vervollständigen und um Aufschluß darüber zu erhalten,in wieweit diese in vitro Ergebnisse auch in vivo ihre Gültigkeit behalten,ist es erforderlich,nicht nur den zeitlichen Verlauf und die Lokalisation der NGF-Synthese (Bueker et al.,1960;Winick and Greenberg,1965;Varon et al.1974;Ayer-Le Lievre et al.,1984) sondern auch die der ß-NGF-Rezeptorexpression in Erfahrung zu bringen.
In dieser Arbeit wurde deshalb die Frage nach dem wann und wo der NGF-Interaktion von der Seite der auf ß-NGF ansprechenden Zielzellen angegangen,und zwar durch die Analyse der Lokalisation und des zeitlichen Verlaufs der ß-NGF-Rezeptorexpression im sich entwickelnden Embryo des Huhns (Gallus domesticus).
Die dabei erhobenen Ergebnisse bestättigen und erweitern die bisherigen Kenntnisse über die Entwicklung der autonomen und sensorischen Ganglien und fügen sich gut in die Diskussion der NGF-Abhängigkeit dieser klassischen Zielorgane ein . Sie zeigen weiter spezifische hochaffine Bindungsstellen für ß-NGF im embryonalen Muskelgewebe,Innenohrepithel und kranialen wie spinalen Motoneuronen,die bis jetzt nicht als Zielorgane der NGF-Wirkung betrachtet worden sind.

MATERIAL UND METHODEN

Material.

ß-NGF wurde aus dem Speichel der NMRI-Mäuse nach der von Burton et al. 1978 beschriebenen Reinigungsprozedur gewonnen. Die Radioiodinierung von ß-NGF wurde nach dem Verfahren von Sutter et al., 1979, mit Lactoperoxidase (Sigma) und Na ^{125}I (Amersham) durchgeführt . Der radioaktiv markierte ^{125}I-ß-NGF wurde innerhalb der darauffolgenden zwei Woche verbraucht. Relaxin ist ein Geschenk von I.Greenwood (University of Hawaii). Insulin wurde von Farbwerke Hoechst AG erworben, bovines Serum Albumin (BSA) und Cytochrom C von Sigma. Die hier beschriebenen monoklonalen Antikörper gegen spinale Ganglienzellen (SGII-1 und SGIII-1) wurden in Form von Kulturmediumüberständen der entsprechenden Hybridomaklone benutzt, die von der Arbeitsgruppe A. Zimmermann gezüchtet worden sind (Sutter and Zimmermann, 1983).

Embryoschnitte.

Befruchtete Hühnereier (White Leghorn, von der Hünerfarm Bermuth, Wittenau) wurden bei 38 °C in einem Eiinkubator (Vomo 5) bebrütet. Bei Herausnahme wurde das Entwicklungsstadium des Huhnembryos nach den Kriterien von Lillie and Hamilton (1952) bestimmt. Die Embryonen wurden in OKT-II (Miles-Lab) eingebettet und im flüssigen Stickstoff eingefroren. In einem Kryostaten (SLEE, Mainz) wurden bei -22 °C die 10 Mikrometer dicke Embryoschnitte angefertigt, auf warmen Objekträgern aufgefangen, bei -30 °C gelagert und während der darauffolgenden Woche verbraucht.

Autoradiographie.

Die Embryoschnitte, die für 5 Minuten am Objektträger angetrocknet worden waren, wurden in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS), die 0.1% BSA enthielt (PBS/BSA) für 30 Minuten vorinkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte für eine Stunde bei 37 °C mit 20 ng/ml ^{125}I-ß-NGF (spezifische Aktivität: 50-60 cpm/pg) in PBS/BSA inkubiert. Die Höhe der unspezifischen ß-NGF-Bindung wurde an Kontrollschnitten ermittelt, die mit 20 ng/ml ^{125}I-ß-NGF und 5 ug/ml nichtmarkiertem (kaltem) ß-NGF inkubiert wurden.

Nach der Inkubation mit ^{125}I-ß-NGF wurden die Objektträger dreimal in PBS/BSA und dreimal in PBS gewaschen, in einer phosphatgepufferter (pH 7.4) 1% Paraformaldehyd-, 2.5% Glutaraldehyd-Lösung bei 37 °C für 30 Minuten fixiert, dann nochmals jeweils einmal in PBS, PBS/BSA und PBS gewaschen und

und bei Raumtemperatur getrocknet.Die Objektträger wurden anschließend im Dunkelraum in die NTB2 Photoemulsion (Kodak) getaucht,die zuvor 1:1 mit Aqua bidest.verdünnt worden war.Die Objektträger wurden daraufhin im Dunkeln für zwei Wochen exponiert,dann für 2 Minuten im Kodak D-19 entwickelt und in Rapid Fix (Kodak) fixiert.Für die weitere Lagerung wurden die Objektträger in 60% Glycerin in PBS eingedeckt.

Die Photographien von den autoradiographierten Embryoschnitten wurden mit Agfa Pan 25 (Professional) in Leitz-Photomikroskop aufgenommen.

Spezifisch gebundenes ^{125}I-ß-NGF wurde nur durch einen Überschuß an unmarkiertem ß-NGF verdrängt,nicht aber durch strukturell verwandte Proteine wie Insulin (Bradshaw et al.,1974) und Relaxin (Niall et al.,1978) in Konzentrationen bis zu 20 ug/ml oder durch Cytochrom C,einem Protein mit einem ähnlichen isoelektrischen Punkt und Molekulargewicht wie NGF bis zu 1 mg/ml.

Die Affinität der spezifischen ^{125}I-ß-NGF-Bindung auf Schnitten (Im Zeitraum vom 8.-16. Embryonaltag, E8-16)wurde annäherungsweise durch Kompetitionsexperimente mit unmarkiertem ß-NGF bestimmt: einige der longitudinalen Embryoschnitte wurden allein mit 0,6 ng/ml (22 pM) ^{125}I-ß-NGF inkubiert und dienten als spezifische Kontrollen.Verglichen mit diesen Kontrollschnitten wurde ein starker Abfall in der spezifischen Bindung des ^{125}I-ß-NGFs bereits im Konzentrationsbereich von 2,7 - 8,1 ng/ml an um diese Bindung kompetierendem unmarkiertem ß-NGF beobachtet.Die Markierungsintensität der stark ^{125}I-ß-NGF bindenden Areale auf den embryonalen Schnitten (Sensorische Ganglien,Muskel und Vorderhornkolumnen des Rückenmarks) nahm bei allen diesen Organen bei steigender Konzentration an kaltem ß-NGF gleichzeitig ab;die halbmaximale Inhibition der spezifischen Bindung wurde bei ca. 5 ng/ml ß-NGF beobachtet. Unter der Berücksichtigung des Molekulargewichts des NGF,der in Lösung als ein Dimer von 27 kD vorkommt (Bocchini and Angeletti,1969),wurde hier eine Dissoziationskonstante von ca. 0,2 nM ermittelt.

Bindungsstudien an nichtenzymatisch dissoziierten Spinalganglienzellen in vitro ergaben eine Dissoziationskonstante von 0,26 nM (Herrup and Shooter, 1973).Die Dissoziationskonstante für ß-NGF-Bindung zu dem mit Triton X-100 solubilisierten NGF-Rezeptor liegt ebenfalls bei ca. 0,2 nM (Bannerjee et al.,1975;Clostrini and Bradshaw,1979).Diese Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung in den aufgrund unterschiedlicher

experimenteller Methoden ermittelten Bindungsparameter des hochaffinen ß-NGF-Rezeptors.

Immunfluoreszenz.

Für die Immunfluoreszenz wurden die Embryoschnitte für 5 Minuten bei Raumtemperatur angetrocknet, in eine feuchte Kammer (in eine bedeckte Petri-Schale auf mit Wasser getränktem Filterpapier) gelegt und mit einem unverdünnten Hybridomaüberstand-SGII-1 oder SGIII-1 überschichtet. Nach der ersten Inkubation von 30 Minuten wurden die Objektträger jeweils dreimal in PBS gewaschen und zum Nachweis der gebundenen monoklonalen Antikörper bei Raumtemperatur für 30 weitere Minuten mit Fluoreszein-gekoppelten Ziegen-anti-Maus-Ig-Antikörpern (Paesel/Antibodies Inc.) inkubiert, die zuvor 1:200 in PBS verdünnt worden waren. Nach drei weiteren Waschschritten in PBS wurden die Schnitte mit 1% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur für 15 Minuten fixiert. Die Photographien wurden mit Kodak-Tri X-Pan (DIN 27) Film im Zeiss PMQ2 Photomikroskop aufgenommen.

E R G E B N I S S E

Der Nachweis von ß-NGF-Rezeptoren in sensorischen, sympathischen und parasympathischen Ganglien und in Nerven.

Embryonale Schnitte wurden während verschiedener aufeinanderfolgender Entwicklungsstadien des Hühnchens, zwischen Embryonaltag 2 (E2) und 10 Tage nach dem Ausschlüpfen (P 10) angefertigt, und nach Inkubation mit ^{125}I-ß-NGF autoradiographiert, wie im methodischen Teil ausgeführt. Benachbarte Schnitte wurden für die Immunfluoreszenzmarkierung mit SGII-1 oder SGIII-1 Antikörpern benutzt. Diese Antikörper dienten zum Nachweis und zur immunhistochemischen Identifikation der peripheren Nerven und Ganglien (SGIII-1) und der zentralen, in den Rückenmark und Hirnstamm auswachsenden Ganglienaxone (SGII-1). Der SGII-1-Antikörper markiert nur die peripheren Ganglionneurone und ihre Neuriten, während der SGIII-1-Antikörper auch die peripheren und zentralen Gliazellen mitmarkiert. Beide Antikörper sind Nervensystem-spezifisch. Durch den SGIII-1-Antikörper können sympathische und spinale Ganglien, wie auch die vorderen und hinteren Rückenmarkswurzeln auf dem Bild 1c identifiziert werden.

Die spezifische NGF-Markierung der Spinalganglien, der Rückenmarkswurzeln und der paravertebralen und paraaortalen sympathischen Ganglien von

Embryonaltag 4 (E4) wird auf dem Bild 1a demonstriert.Die unspezifische Bindung wird auf dem Bild 1b gezeigt.Die Bilder 2a und 2b zeigen die entsprechende spezifische und unspezifische Markierung der kranialen sensorischen Ganglien.

Erst ab E4 konnte spezifische,wenngleich noch schwache Markierung der sensorischen und sympathischen Ganglien gezeigt werden.Parallel mit der Entwicklung des peripheren Nervensystems nahm die spezifische Bindung von ^{125}I-ß-NGF zu den Ganglien und peripheren Nerven zu.Die Markierungsintensität war besonders stark zwischen E6 und E12,mit einem Maximum bei E8.Die relative Intensität der NGF-Bindung zu den Ganglia und anderen rezeptorpositiven Geweben während der Entwicklung wird in der Tabelle I aufgelistet.

Aus entwicklungskinetischen Studien ist es bekannt,daß die spinalen Ganglien aus zwei neuronalen Populationen bestehen,deren Entwicklung in voneinander verschieden Zeiträumen abläuft.Die eine Zellpopulation ist dorsomedial und die andere ventrolateral lokalisiert (Levi-Montalcini and Angeletti, 1968;Hughes and McMillan,1978;Hamburger et al.,1981).Es war von daher interessant zu sehen,daß die Verteilung von NGF-Bindungsstellen im Spinalganglion nicht gleichförmig ist.Bild 5a zeigt das Muster der Ganglionmarkierung bei E8.In dem dorsomedialen (dm-) Gebiet des Ganglions konnten stark markierte,dicht aneinandergedrängte Zellprofile beobachtet werden,während der ventrolaterale (vl-) Teil mit Ausnahme einer sehr kleinen Zahl singulärer,eindeutig markierter Zellprofile nur schwach und diffus markiert war.Die schwache und diffuse Markierung der vl-Region war bis E16 verschwunden.Dagegen konnten einzelne stark markierte Zellprofile auch noch postnatal beobachtet werden.

Von E14 an beschränkte sich die starke Markierung auf eine allmählich kleinerwerdende Zellpopulation,die zum größten Teil auf den dorsomedialen Abschnitt des Ganglions konzentriert war.Bild 12a zeigt die Verteilung der ß-NGF-rezeptorpositiven Ganglienzellen am P3.

Ein ähnliches zeitliches und räumliches Muster der ß-NGF-Rezeptorexpression wie in den Spinalganglien wurde auch in den kranialen sensorischen Ganglien beobachtet.So verhielten sich die vom kranialen Neuralleistenepithel abstammenden, proximalen Ganglien, wie das Fazialiswurzelganglion des 7.Hirnnervs (N.VII),das Ganglion glossopharyngeus superior (N.IX),das Ganglion jugularis (N.X) und der dorsomediale Teil

des Ganglion trigeminale (N.V) in der NGF-Rezeptorexpression wie die dorsomediale Region der Spinalganglien (siehe Tabelle I).

Der zweite Teil der sensorischen Ganglien des Kopfes hat eine andere Entstehungsgeschichte. Während die Gliazellen noch vom Neuralleistenepithel abstammen, entstehen die Neurone dieser distalen Ganglien in den epibranchialen Plakoden des Embryos (Le Douarin, 1982). Diese Ganglien - Ganglion geniculatum (N.VII), Ganglion vestibulocochleare (N.VIII), Ganglion petrosum (N.IX), Ganglion nodosum (N.X) und der ventrolaterale Teil des Ganglion trigeminale (N.V) - zeigten, ähnlich wie die ventrolateralen Gebiete der Spinalganglien, durch die ganze frühe Entwicklung hindurch nur eine schwache und diffuse Markierung, mit Ausnahme stark markierter Faszikel, die meist peripher an der Zirkumferenz, das Ganglion durchzogen und die Neuriten der benachbarten proximalen, sensorischen, ß-NGF-rezeptorpositiven Ganglien darstellten. Das Bild 6a, eine Autoradiographie eines Kopfschnittes in Hirnstammhöhe bei E8, zeigt beispielhaft die schwache Markierung des plakodalen Ganglion petrosum im Vergleich zu der starken Markierung des vom Neuralleistenepithel abstammenden Ganglion glossopharyngeus superior; stark markiert sind außerdem einzelne Nervenfaserbündel des Nervus glossopharyngeus (N.IX) und das sympathische Ganglion cervicale superior.

Sympathische Ganglien waren NGF-rezeptorpositiv vom E4-P10, dem spätesten, in dieser Arbeit untersuchten Entwicklungsstadium. Im Gegensatz zu der ungleichen Verteilung der ß-NGF-Rezeptoren in Spinalganglien, zeigten sympathischen Ganglien eine verhältnismäßig homogene Markierung durch die ganze Entwicklung hindurch. Schnitte von postnatalen Stadien (s. Bild 12a) zeigten eine starke Markierung des Ganglions in Gebieten, wo die Zellsomata dicht gepackt beieinanderlagen und nur schwache Markierung der Nervenfasern, die in das Ganglion hereinkommen oder ihn durchqueren.

Rein parasympathische Ganglien (z.B. Ganglion ciliare) gehören nicht zu der Liste klassischer ß-NGF Zielorgane (siehe z.B. Levi-Montalcini and Angeletti, 1968). Umso interessanter ist das NGF-Bindungsverhalten während der frühen Embryogenese. Das Bild 4a zeigt die spezifische ^{125}I-ß-NGF Markierung des Ganglion ciliare bei E6. Anders als zum Beispiel die Spinalganglien, zeigt dieses Ganglion eine sehr frühe und kurze, aber dennoch starke Expression der NGF-Rezeptoren von E3-E7, die bei E8 schon fast gänzlich verschwunden sind (siehe Tabelle I). Das Ganglion ciliare

wird viszeromotorisch durch Nervus oculomotorius,den 3.Hirnnerven versorgt,der gleichfalls in der Lage ist ^{125}I-ß-NGF spezifisch zu binden.Allerdings bleiben die NGF-Rezeptoren auf dem Nerv etwas länger,bis E10 nachweisbar.

Ein weiteres Derivat des Neuralleistenepithels neben den spinalen,sympathischen und parasympathischen Ganglien ist die Nebennieremarkanlage.Die embryonale Nebenniere zeigte,ähnlich den plakodalen Ganglien,eine starke Markierung der die Nebenniere umschließenden Fasern,mit einzelnen gut markierten Strukturen in der Anlage selbst.Das Gros der embryonalen Nebenniere war unmarkiert.Bild 8 zeigt die spezifische Markierung der Nebennieren bei E6.Die lichtmikroskopische Verteilung der ß-NGF markierten Strukturen spricht für deren Identifikation als chromaffine Nebennierenmarkzellen,die während der frühen Embryonalentwicklung diffus in der Nebenniere verteilt sind,und erst während der Spätphase sich zum anatomisch definierten Nebennierenmark formieren (Le Douarin,1982).Während der Ontogenese kommt es bei den chromaffinen Zellen,ähnlich wie bei den parasympathischen und ventrolateralen Spinalganglien-neuronen zum Erlöschen der ß-NGF-Rezeptor-expression,adulte Nebennierenmarkzellen sind NGF-rezeptornegativ (siehe Tabelle I).

Die Rezeptoren auf den Neuriten rezeptorpositiver sensorischer Ganglien konnten sowohl auf ihren Efferenzen,den in Rückenmark und Hirnstamm mündenden zentralen Axone,wie auch auf ihren Afferenzen,den in die peripheren Zielgebiete auswachsenden Neuriten nachgewiesen werden. Bild 9 zeigt die ß-NGF-Rezeptorexpression auf dem Plexus brachialis in einem longitudinalen Schnitt des Plexus des 8 Tage alten Hühnerembryos (E8).Im Bild 13a,einem Querschnitt durch einen Flügel gleichen Entwicklungsstadiums sind mehrere angeschnittene Nerven als ^{125}I-ß-NGF markierte schwarze Flecke sichtbar.Die Serie der schwarzen Flecken unter der Haut stellen die NGF-rezeptorpositive Hautnerven dar.Sie alle konnten mit dem SGIII-1-Antikörper durch die Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.Interessanterweise war die ^{125}I-ß-NGF-Markierung der peripheren Nerven nicht homogen, sondern zeigte ein deutlich faszikuläres Bindungsmuster.Im Gegensatz zu der bleibenden Markierung auf den sensorischen und sympathischen neuronalen Perikaryen konnten die Haut-,Muskel-und gemischten Nerven in späteren Entwicklungsstadien nicht mehr mit ß-NGF markiert werden.Ihre Markierung war bei E14 deutlich reduziert,bei E16 kaum noch feststellbar

und nach E20 nicht mehr nachweisbar (Bild 11 b).Die Bindung von ^{125}I-ß-NGF an die sympathischen viszeralen Nerven und an die rami meningei (Bild 11a) konnte noch postnatal beobachtet werden.

Das teilweise auch vom Neuralleistenepithel abstammende kraniale Skelett zeigte keine spezifische ^{125}I-ß-NGF-Bindung während der Embryogenese.

Expression von ß-NGF-Rezeptoren im Muskelgewebe.

Das am stärksten markierte Areal auf den Autoradiographien der E4-Embryoschnitte war auf dem Gebiet des somatischen Myotoms lokalisiert (Bild 1a).Schon bei E3 konnte in der Region des somatischen Mesoderms eine diskrete Markierung beobachtet werden.Es zeigte sich,daß die NGF-Bindung zu Muskelgewebe stark entwicklungsabhängig ist.Die NGF-Rezeptorexpression war nur passager,wobei sich das Rezeptorverteilungsmuster sehr bemerkenswert veränderte (Tabelle I).Während der frühen Entwicklung (E3-E8) wurden Muskelareale in allen Teilen des Embryos markiert.Allerdings war die Markierung nicht total,ein Teil der Muskelanlagen wurde nicht markiert.Wie auf der Autoradiographie eines Flügelschnittes bei E8 gezeigt werden kann,ist nur einer der Muskel stark markiert,während andere nur schwach markiert oder gänzlich unmarkiert erscheinen (Bild 13a).Ab E12 war die Eigenmarkierung der Skelettmuskulatur nicht mehr zu beobachten.Mit dem Verschwinden der Bindungsstellen in der Muskelmasse wurde die spezifische Bindung von ^{125}I-ß-NGF an der Nahtstelle zwischen Muskel- und Bindegewebe unterscheidbar.Dies wird im Bild 14a demonstriert,welches eine Autoradiographie eines Teils eines E15 Flügelquerschnitts zeigt.Die Immunfluoreszenzmarkierung mit dem SGIII-1-Antikörper im Bild 14c weist die peripheren Nerven auf dem darauffolgenden Schnitt nach. ^{125}I-ß-NGF und SGIII-1 binden nicht an den gleichen Stellen.Dies,zusammen mit der Beobachtung, daß die Muskelzirkumferenz auf allen Schnittebenen erscheint, spricht dafür,daß es sich nicht um Nerven oder Nervenendigungen handelt, sondern daß hier eine ubiquitärere Randzonenstruktur,die zwischen Muskel- und Bindegewebe lokalisiert ist,markiert wird.Eine stärkere Vergrößerung zeigt eine in ihrer Breite undulierende Struktur,die wahrscheinlich eine spezialisierte Mesenchymschicht darstellt. ^{125}I-ß-NGF-Bindung an die Muskel-Bindegewebsgrenze trat zwischen E14 und E16 besonders stark hervor.Ab E20 war sie nicht mehr nachweisbar (Bild 11b).

Expression der ß-NGF-Rezeptoren in den Sinnesorganen.

Die Innenohranlage stellt sich in dieser Arbeit als ein weiteres

potentielles Zielorgan der ß-NGF-Wirkung dar.Ähnlich den Motoneuronen und den Muskelanlagen war die Markierung nur partiell.Große Teile des Innenohrepithels und das sich aus der Innenohrplakode entwickelnde Ganglion vestibulochochleare waren kaum markiert.Die spezifische ß-NGF-Bindung trat sehr früh auf und verschwand zu einem ähnlichen Zeitpunkt wie die der kranialen Muskelanlagen.Bild 3a zeigt die starke spezifische aber nur partielle Markierung des Innenohrepithels am E4.

Andere Sinnesorgananlagen,wie die Retina oder das Geruchsepithel zeigten im Verlauf der ganzen Entwicklung nur eine recht schwache Markierung.

Expression von ß-NGF-Rezeptoren im Rückenmark und Hirnstamm.

Schon um E4 konnten starke Anzeichen von spezifischer ^{125}I-ß-NGF-Bindung in Autoradiographien von Querschnitten,sowohl im vorderen wie im hinteren Teil des Rückenmarks (Bild 1a) und Hirnstamms (Bild 2d) wahrgenommen werden. Bilder 5a,9 und 10 zeigen die drei Gebiete des Rückenmarks,die bei E8 deutlich markiert sind nämlich die Hinterwurzeleingangszonen,die Hinterstränge und die motorischen Vorderhorngebiete.

Bild 6a zeigt die deutliche Markierung der Eingangszone des zentralen Astes des Nervus glossopharyngeus im Hirnstamm.In dem posterioren Rückenmark waren die Hinterwurzeleingangszonen und die Hinterstänge,die mit dem SGII-1-Antikörper durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnten, unterschiedlich markiert.Die mäßige bis schwache Markierung der Hinterstränge verschwand während der späteren Entwicklung(E14).Die Markierung der zentralen Axone der Spinalganglien in der Eingangszone war bei E8 sehr intensiv und während der ganzen Entwicklung nachweisbar.Ähnlich der reduzierten ^{125}I-ßNGF-Bindung auf den Spinalganglien spät in der Entwicklung,nahm die Markierung ihrer zentralen Axone in der Hinterwurzeleingangszone ab (siehe Tabelle I).Sensorische Efferenzen,die die graue Substanz auf dem Weg zu den motorischen Vorderhörnern passieren, konnten weder durch die ^{125}I-ß-NGF-Autoradiographie noch mit SGII-1 Immunfluoreszenz dargestellt werden.

Die Größe des mit ^{125}I-ß-NGF markierten Vorderhorngebiets veränderte sich in der rostro-kaudalen Längsachse des Rückenmarks (Bild 10).Longitudinalschnitte zeigten,daß das markierte Gebiet in der Höhe der zervikalen und lumbalen Rückenmarksintumeszenz besonders groß war,während auf anderen Höhen kaum oder keine Markierung nachweisbar war.Die Verteilung der ^{125}I-ß-NGF-Bindungsstellen korrelierte dabei deutlich mit dem Motoneuronenverteilungsmuster im Rückenmark,und zwar in der Lateralen Motorkolumne.

Eine Markierung der Medialen Motorkolumne des Vorderhorns oder eine Markierung des viszeralen Motoneuronengebiets (Columna Terni),das später das Seitenhorn im Rückenmark bildet,wurden nicht beobachtet.Das Verteilungsmuster und die Intensität der ^{125}I-ß-NGF-Bindung im Vorderhorn des Rückenmarks war entwicklungsabhängig.Es ist interessant anzumerken,daß die ß-NGF-Bindung zu den somatischen Motoneuronen und zu den Muskelanlagen zeitlich parallel lief.Dies gilt sowohl für spinale Motoneuronen wie für die Motoneurone der Grundplatte des Hirnstamms (Tabelle I).Allerdings ist der zeitliche Verlauf der NGF-Rezeptorexpression auf kranialen Motoneuronen (E3-E9) gegenüber dem der spinalen Motoneurone (E4-E12)in der Entwicklung etwas nach vorne verschoben.Ähnliches gilt auch für den zeitlichen Verlauf der Rezeptorexpression in der kranialen Skelettmuskulatur gegenüber dem der Körpermuskulatur.Dies läßt sich am ehesten durch die häufig beschriebene rostro-kaudale Reifungsdifferenz erklären (Hamburger,1952;Harris-Flanagan,1970).

Mit der Vergrößerung der motorischen Kerngebiete während der Entwicklung und der damit einhergehenden größeren räumlichen Auflösung,wurde auch der inhomogene Verteilungstyp der ß-NGF-Bindungsstellen auf den Motoneuronen der Lateralen Motorkolumne deutlich (siehe Bild 5a und 9),der inhomogenen Verteilung auf Muskelanlagen nicht unähnlich.Die Markierung auf den Motoneuronen verschwand zu dem Zeitpunkt,als das Markierungsmuster auf den Muskelanlagen,von einer Markierung der Muskelmasse zu der eingeschränkten Verteilung auf die Zone zwischen Muskel- und Bindegewebe umschaltete.

Spezifische,aber schwache Markierung wurde während dieser Arbeit auch im basalen Teil des Striatums,in Tectum und in anderen Teilen des Gehirns während der frühen Entwicklung gesehen.Die Intensität der Markierung war mit der von plakodalen,sensorischen Ganglien vergleichbar (z.B.Ganglion vestibulocochleare).Im Gegensatz zu dieser recht schwachen Markierung in fast allen Gehirnarealen,waren die Eingangszonen der Axone der von der Neuralleiste abstammenden sensorischen Ganglien und die motorischen Kerngebiete des Hirnstamms so stark wie die der Hinterwurzeleingangszonen und der Lateralen Motorkolumnen des Rückenmarks markiert.

Erklärung zu der Tabelle I:eine etwas subjektive Einteilung der NGF-Markierung von +++ = sehr stark,++ = stark,+ = schwach bis (+)= sehr schwach wurde benutzt,um die Zunahme und den Abfall der spezifischen ß-NGF-Bindungsstellen anhand der optischen Dichte der Markierung zu beschreiben.Bei den mit * versehenen Intensitätsangaben war die Markierung inhomogen.

Tabelle I

Die Intensität der ß-NGF-Rezeptorexpression während der Entwicklung

	E2	E3	E4	E6	E8	E10	E12	E14	E16	E20	P0	P3
peripheres Nervensystem												
A.Ganglien: spinale -												
- dm-Region	0	0	+	+++	+++	+++	+++	++	++*	++*	++*	++*
- vl-Region	0	0	+	+	+	+	+	(+)	(+)	0	0	0
kraniale sensorische -												
- proximale	0	0	+	+++	+++		+++		++*		++*	+*
- distale	0	0	+	+	+		(+)		0		0	0
sympathische	0	0	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
parasympathische	0	+	++	++	(+)		0		0		0	0
B.Nerven:												
somatische -												
- Muskeläste	0	0	+++	+++	+	0	0	0	0		0	0
- Hautäste	0	0	+	+++	+++	++	++	+	(+)		0	0
- gemischte	0	0	+	+++*	+++*	++*	++*	+*	(+)*		0	0
viszerale -												
- sympathische	0	0	++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+
- parasympathische	0	0	++	++	(+)		0		0		0	0
Sinnesorgane:												
Innenohranlage	0	0	+++*	++*	(+)*		0		0		0	0
Retina	0	(+)	(+)	+	+		(+)		0		0	0
zentrales Nervensystem:												
A.Hirnstamm -												
- motorische Nuclei	0	+	+++	+++	+		0		0		0	0
- zentrale Ganglienaxone	0	0	++	+++	+++		++		+		(+)	(+)
B.Rückenmark -												
- Laterale Motorkolumne	0	0	++	+++	++*	+*	0	0	0	0	0	0
- Hinterstränge	0	0	0	+	+	+	(+)	0	0	0	0	0
- Vorderwurzel	0	0	++	++*	+*	(+)*	0	0	0	0	0	0
- Hinterwurzel	0	0	++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+
Skelettmuskulatur:												
Muskelanlagen	0	+	+++*	+++*	++*	(+)*	0	0	0	0	0	0
Muskelzirkumferenz	0	0	0	0	0	0	+	+++	+++	0	0	0
andere Organe:												
Nebennierenanlage			+++	+++	++							

D I S K U S S I O N

In dieser Arbeit wurde der zeitliche Verlauf und die räumliche Verteilung der ß-NGF-Rezeptorexpression im sich entwickelnden Hühnerembryo erarbeitet. Frühere in vitro Studien auf Zellsuspensionen (Sutter et al., 1977) bestättigend, wurden die NGF-Rezeptoren schon bei E4 in Spinalganglien nachgewiesen. Auch sympathische und parasympathische Ganglien exprimierten die NGF-Rezeptoren schon in dieser frühen Entwicklungsphase. Die Rezeptorexpression auf den Spinalganglien ist deutlich entwicklungsabhängig - die NGF-Rezeptorexpression am E3 war nicht nachweisbar und am E4 noch deutlich schwächer als z.B. am E8. Diese Arbeit liefert Anhaltspunkte dafür, daß der ß-NGF-Rezeptor erst bei den postmitotischen, definitiven Neuronen exprimiert wird. Die Markierung in der Position der Spinalganglien fehlt vor E3,5 , dem Zeitpunkt, zu dem dort die ersten Ganglienneuroblasten ihre terminale Mitose abgeschloßen haben (Hughes and McMillan-Carr, 1978).

Dies gilt nicht nur für Neurone in den sensorischen Ganglien. In in vivo Transplantationsexperimenten konnte von Le Douarin und ihren Mitarbeitern ermittelt werden, daß auch "gereifte" autonome Ganglien (E8 und später), wie z.B. das parasympathische Ganglion ciliare supprimierte autonome Vorläuferzellen enthalten, die bei Transplantation in die kaudale Neuralleiste eines anderen Embryos am E2 zu sympathischen (Dupin, 1984), und damit auch NGF-abhängigen Neuronen sich differenzieren können. Auf den supprimierten autonomen Vorläuferzellen in situ , z.B. im Ganglion ciliare am E9 sind die NGF-Rezeptoren allerdings nicht nachweisbar.

Wenn nun hochaffine NGF-Rezeptoren erst auf den definitiven, postmitotischen Neuronen exprimiert werden, so wird auch wahrscheinlich, daß nicht ß-NGF als Reifungssignal auf die neuronalen Vorläuferzellen wirkt, um den Teilungszyklus zu beenden, sondern weist darauf hin, daß hier ein anderes Differenzierungssignal erforderlich ist (End et al., 1983) - z.B. um den NGF-Rezeptor erstmals zu exprimieren.

Es ist bekannt, daß die Wachstumsfaktoren in der Lage sind, ihre Zielzellen in ihrem proliferativen und Wachstumsverhalten zu beeinflußen. In der letzten Zeit wird zunehmend deutlich, daß ein wesentlicher Teil ihres Wirkungsmechanismus in der Regulation von Rezeptoren für andere Wachstums- und Differenzierungsfaktoren besteht. So führt die Applikation von Interleukin-2 auf mitogen-stimulierten menschlichen T-Lymphozyten zu der

Induktion der Rezeptoren für Transferrin, eines anderen Wachstumsfaktors. Wenn der Transferrinrezeptor einmal durch Interleukin-2 exprimiert wurde, kommt es zu DNA-Synthese, auch wenn die Interleukin-2 Rezeptoren inzwischen durch monoklonale Antikörper blockiert werden (Neckers and Cossman, 1983). Der Entzug des Fibroblastenwachstumsfaktors aus dem in vitro Kulturmedium der unreifen Myoblasten ist verantwortlich für den Verlust von Epidermalwachstumsrezeptoren auf den Myoblasten und führt zur terminalen Differenzierung in Muskelzellen, auch wenn nach der Induktion der Differenzierung der Fibroblastenwachstumsfaktor wieder zugesetzt wird. Für die Aufklärung des "Entwicklungsnetzwerks" des Nervensystems wird es interessant sein zu ermitteln, welches Differenzierungssignal auf die Neuralleistenvorläuferzellen bei der Induktion des NGF-Rezeptors wirksam wird. Im zweiten Schritt wäre dann die Ermittlung des zeitlichen Verlaufs und des Syntheseorts dieses Signals möglich.

Welche Bedeutung dem Nervenwachstumsfaktor in der Frühphase der ß-NGF-Rezeptorexpression auf den sensorischen und autonomen Ganglienneuronen (E4-E6) zukommt ist bisher nicht eindeutig geklärt. Schon in dieser Frühphase ist der NGF-Rezeptor auf den zentralen Axonen der sensorischen Ganglien und ihren Endigungen im Hirnstamm und Rückenmark nachweisbar. Ob die sympathischen und parasympathischen Neurone am E4 auf das NGF-Signal mit vermehrtem Auswachsen der Neuriten antworten, ist bisher unbekannt. Von den sensorischen Ganglien ist es allerdings bekannt, daß diese, im Gegensatz zu späteren Entwicklungsstadien (ab E6) spontan Neuriten aussprießen und den Nervenwachstumsfaktor dafür nicht benötigen (Luduena, 1973). Diese Daten werden durch weiter Experimente von Lumsden and Davies (1983) ergänzt, die in vitro demonstrierten, daß das gerichtete (chemotaktisch gesteuerte) Wachstum der sensorischen Neuriten auf ihr Zielorgan (in diesem Fall die Whiskeranlage), um den Zeitpunkt der in vivo stattfindenden Innervation nicht durch NGF-Antikörper blockierbar war, und daß die NGF-Synthese erst nach der sensorischen Innervation einsetzte.

ß-NGF kann allerdings das physiologisch auftretende Zellsterben, sowohl unter den ventrolateralen wie den dorsomedialen Spinalganglienneuronen verhindern, die nach der sensorischen Innervation ihrer Zielgebiete auftritt - zwischen E5 und E6,5 bei ventrolateralen und um E9 bei den dorsomedialen Neuronen. Etwas später, nach der Bildung funktionsfähiger synaptischer Verbindungen ist ß-NGF für die weitere Reifung und die Differenzierung

neurochemische Differenzierung,u.a.auch die Induktion der Neuropeptidsynthese erforderlich (Otten et al.,1980;Kessler and Black,1980).

Bei der Analyse des Mechanismus und der Rahmenbedingungen der Neuritenaussprossung in vitro wird von mehreren Autoren unterschieden,ob die in vitro stattfindende Neuritisation primär oder sekundär,d.h.regenerativ ist (Luduena,1974;Lumsden and Davies,1983).

Die primäre Neuritenaussprossung findet statt,wenn die Ganglienneurone vor dem Zeitpunkt des Aussendens der Neuriten in vitro explantiert werden. Sekundäre Aussprossung kommt dagegen zustande,wenn die Ganglienneurone noch vor der Explantation ihre Zielorgane erreicht haben und mit ihnen schon in trophischem Kontakt stehen.Die Explantation der Neurone zu diesem Zeitpunkt führt zum Verlust ihrer primären Neuriten und wichtiger noch,beraubt sie ihrer neuen Quelle trophischer Faktoren,ihres peripheren Zielorgans.

Die Neuritenaussprossung der sensorischen Neurone findet in vivo in dem Zeitraum E3,5 - E8 statt (Honig,1982;Fontaine-Perus et al.,1985).Dabei verändert sich auch das Verhältnis der primär neuritisierenden zu den regenerierenden Neuronen nach der Ganglienexplantation.Während die Zahl der primär neuritisierenden,noch wenig differenzierten Neurone von E4-E8 abfällt,steigt die Zahl der nach Explantation unter geeignetem trophischen Einfluß regenerierenden Neurone.

Dies schlägt sich im Verhältnis der spontanen und der NGF-induzierten Neuritenaussprossung offensichtlich nieder.Die spontane Aussprossung,die ohne den Zusatz neurotropher Faktoren stattfindet,ist bei E4 am stärksten ausgeprägt und nimmt daraufhin rapide ab,sie ist nach E8 kaum noch nachweisbar (Lumsden and Davies,1983).Umgekehrt verhält sich die NGF-induzierte Neuritisation,die bei E8 maximal ist,zu einem Zeitpunkt,wo fast alle Neuriten in Kultur regenerierende Nervenfortsätze sind.Die auf Embryoschnitten nachgewiesene NGF-Rezeptordichte korreliert dabei gut mit der Stärke der NGF-induzierten,regenerativen Neuritisation.Der schwierige Nachweis der mit NGF-induzierten Neuritenaussprossung bei E4 beruht wahrscheinlich auf dem niedrigen "signal to background ratio" - d.h. der niedrigen Zahl der schon bei E4 unter trophischem Einfluß regenerierenden Neurone.

Die Diskussion der NGF-Rezeptorverteilung auf spinalen sensorischen Ganglien wäre nicht vollständig ohne die Berücksichtigung des späteren zeitlichen Verlaufs der Expression.Schon bei E6,ist zu beobachten,daß die

räumliche ß-NGF-Rezeptorverteilung auf den Spinalganglien nicht mehr homogen ist.Während die Markierung des ventrolateralen Gebietes sich abschwächt,dauert die Markierung in den dorsomedialen Gebieten der Spinalganglien und in den proximalen,sensorischen Kopfganglien an.Applikation von ß-NGF zu einem späteren Zeitpunkt,z.B.am E8 führt deshalb nur zu einer Verminderung des Zellsterbens in dem dm-Gebieten der Spinalganglien und in den proximalen Kopfganglien (Levi-Montalcini and Angeletti,1968).

In den sehr späten Stadien (ab E16-) der Entwicklung wird die Markierung selbst in diesen Gebieten fragmentarisch,parallel gehend mit der Abschwächung der NGF-induzierten Neuritisation auf Ganglienexplantaten in vitro (Davies and Lumsden,1984).Allerdings bleibt die Fähigkeit des Nervenwachstumsfaktors bei geeigneten Rahmenbedingungen (vor allem bei Gabe eines "peripheral neurite promoting factors" wie Laminin) die NGF-rezeptortragende Neurone in in vitro Kultur am Leben zu erhalten weiter bestehen (Edgar and Thoenen, persönliche Mitteilung).

Ohne die elektronmikroskopische Autoradiographie ist es schwierig abzuschätzen,in wieweit die NGF-Rezeptoren auf Schwannschen und auf Satelitten-zellen,den nichtneuronalen Bestandteilen peripherer Nerven und Ganglien exprimiert werden.Ein niedrig affiner (K_D = 2 nM) NGF-Rezeptor konnte auf diesen Zellen in vitro nachgewiesen werden (Zimmermann and Sutter,1983;Rohrer and Sommer,1983).In wieweit diese Zellen zu der schwachen Markierung in der ventrolatralen Region und der starken Markierung der dorsomedialen Region in den Spinalganglien und ihrer peripherer Nerven beitragen ist nicht ganz klar.Ihr Beitrag ist vermutlich gering,da die NGF-rezeptorpositiven Gliazellen wahrscheinlich auch die Quelle der schwachen Markierung der distalen sensorischen Kopfganglien sind, die die von der kranialen Neuralleiste abstammende Gliazellen und die von der Plakode abstammende Neurone enthalten.

Diese Arbeit hat demonstriert,daß ß-NGF-Rezeptoren nicht nur auf den neuronalen Somata und den peripheren sensorischen Neuriten exprimiert werden,sondern auch auf den auswachsenden zentralen Axonen in den Hintersträngen und in dem Tractus Lissauer des Rückenmarks.Da Neurone wahrscheinlich noch viel besser als die Epithelzellen in der Lage sind,eine polarisierte Membranspezialisation aufrechtzuerhalten,ist diese Beoabchtung nicht trivial,sondern deutet auf die Rolle des Nervenwachstumsfaktors oder eines eng-verwandten Proteins in dem Prozeß

des Wachstums,Chemotaxis,Sprouting und/oder Aufrechterhaltung der sensorischen Axone im Zentralnervensystem hin. In einigen neueren Arbeien wurde NGF-kreuzreagierendes Material im Hirnstamm (Benowitz and Shashoua,1979) und im Rückenmark (Ayer-Le Lievre et al.,1984) der Rattenembryos nachgewiesen.In der letzten Zeit erschiernen außerdem mehrere Arbeiten,die nachwiesen,daß ß-NGF spezifisch retrograd aus dem Zentralnervensystem in die sensorischen Ganglienneurone transportiert werden kann (Richardson and Riopelle,1984).Es wurde weiter gezeigt,daß Applikation von ß-NGF das Überleben dieser Neurone sowohl nach Durchtrennung peripherer Axone durch periphere Nervenschädigung wie zentraler Axone nach Durchtrennung der Hinterwurzel fördert (Yip and Johnson,1984)

Im Gegensatz zu der bleibenden,deutlichen Markierung der dorsomedialen Region der Spinalganglien und ihrer zentralen sensorischen Axone sind periphere somatische Nerven und ihre Haut- und Muskel-äste in den sehr späten Stadien der Embryonalentwicklung (ab E20-) unmarkiert. Dies könnte durch asymetrische Verteilung der ß-NGF-Rezeptoren im Neuron, oder durch spezifische "Down-Regulation" der Rezeptoren auf der Axonenmembran der peripheren Nerven im Gegensatz zu den neuronalen Perikaryen bedingt sein.Eine andere Erklärung wäre die zu geringe Sensitivität der autoradiographischen Methoden zum Nachweis der radioaktiven Markierung auf einer verminderten Zahl der NGF-rezeptorpositiven dünnen und unmyelinisierten Fasern der schmerz- und temperaturempfindlichen Neuronen (Johnson et al,1983;Otten et al,1984),verstreut unter den vielen NGF-rezeptornegativen myelinisierten Nervenfasern des ausgereiften peripheren Nervs.Die Reduktion der Rezeptorbindung wäre hier u.a. durch einen sich vergrößernden Flächenanteil der NGF-rezeptornegativen myelinisierenden Neuriten im Querschnitt der peripheren Nerven während der Myelinisierung bedingt.

Folgende Überlegungen sprechen gegen die Vermutung,daß der verminderte NGF-Rezeptornachweis im peripheren Nerv während der Entwicklung durch die zu niedrige Sensitivität der Methode bedingt sein könnte.Die NGF-rezeptorpositiven Neuriten sind nicht homogen verstreut im peripheren Nerv verteilt,sondern sind deutlich faszikularisiert.Auf Nervenlängsschnitten von E6-E16 können die markierten,longitudinal verlaufenden Nervenbündel demonstriert werden,umgeben von NGF-rezeptornegativen Fasern.Während der

Embryonalentwicklung wird die NGF-Markierung auf diesen NGF-rezeptor-positiven Faszikeln zunehmend schwächer und ist ab E20 nicht mehr lichtmikroskopisch nachweisbar.Es wird vermutet,daß dies mit der zunehmenden Effektivität des retrograden Transports neurotropher Faktoren aus der Peripherie wähend der neuronalen Reifung zu tun hat.Nach Unterbrechung des retrograden Transports durch Setzen einer peripheren Nervenläsion taucht dieses faszikuläre Markierungsmuster auf regenerierenden Neuriten des proximalen Nervenstumpfs wieder auf.Dabei scheint die "up- and down-regulation" der NGF-Rezeptoren auf NGF-abhängigen sensorischen Neuriten im umgekehrtem Verhältnis zu der trophischen Stimulation aus der Peripherie zu stehen.Diese Vorgänge erinnern an die ähnlich ablaufende Regulation anderer Rezeptoren,z.B. für Insulin (Gavin et al.,1974),Glukagon (Soman and Feilig,1978) oder Katecholamine (Mukherjee et al.,1975) in Abhängigkeit von Mangel oder Überfluß der entsprechenden Hormone und Neurotransmitter. Die Persistenz der ß-NGF-Rezeptorsynthese und Expression,wenn auch auf einem niedrigeren Level im adulten Organismus ist offensichtlich eine Voraussetzung für den beobachteten retrograden axonalen Transport des NGFs aus der Peripherie in einen Teil der sensorischen Neurone des erwachsenen Tieres.Dies bestättigend wurde im Rahmen dieser Arbeit die NGF-Rezeptorexpression nicht nur beim Huhn sondern auch bei adulten Exemplaren anderer Tierarten wie z.B. Maus und Ratte beobachtet.Trotz der nur noch schwach nachweisbaren Markierung der peripheren Nerven und ihrer Innervationsfelder in Muskel und Haut,deutet der spezifische retrograde Transport von ß-NGF auf die Intaktheit des NGF-interagierenden Systems in der Peripherie des adulten Tieres hin (Stöckel et al.,1975;Richardson and Riopelle,1984).

Anders als in Spinalganglien zeigen die sympathischen Ganglien und Nerven relativ hohe Spiegel der ^{125}I-ß-NGF-Bindung bis in die späte Embryonalphase und sogar in der Zeit nach dem Ausschlüpfen.Dies stimmt mit der beobachteten verlängerten Sensitivität der sympathischen Neurone auf Injektion von Anti-ß-NGF-Antikörpern überein (Levi-Montalcini and Angeletti,1968).So führte die Applikation der Antikörper bei neugeborenen Ratten zu einer dramatischen Verringerung der Neuronenzahl in den sympathischen Ganglien,beeinflußte aber nicht die Zahl der sensorischen Neurone.Durch den Nachweis der NGF-Rezeptoren auf den zentralen sensorischen Neuriten könnten diese Ergebnisse auch folgendermaßen

interpretiert werden.Spät in der Entwicklung,mit dem Aufbau der Blut-Hirnschranke könnten die sensorischen Ganglienneurone im Gegensatz zu den sympathischen,zentrale NGF- Quellen "anzapfen",die nicht durch die im Blut zirkulierende Anti-ß-NGF-Antikörper neutralisierbar wären.

Ein letzter Punkt bei der Diskussion der NGF-Wirkung auf die klassischen Zielorgane ist die während dieser Arbeit nachgewiesene in vivo Faszikularisation der NGF-rezeptorpositiven Neuriten.Die Aggregation von unmyelinisierten Neuriten,die in elektron-mikroskopischen Studien als die NGF-abhängigen Nervenfasern demonstriert wurden (Johnson et al.,1983; Otten et al.,1984),ist nicht nur auf die Embryonalentwicklung beschränkt. Auch in vitro kommt es beim Zusetzen des Nervenwachstumsfaktors,nicht aber von anderen trophischen Faktoren (F.Boegner,persönliche Mitteilung) zur Aggregation der sensorischen Neurone und ihrer Neuriten.Diese Faszikularisation scheint eine NGF-vermittelte Wirkung zu sein,möglicherweise ist das dimere NGF-Molekül dabei direkt beteiligt.

Es ist denkbar,daß das dimere NGF -die Rezeptoren auf zwei nebeneinanderliegenden Neuronen vernetzt und dadurch die Aggregation induziert.Ein etwas anderes Szenarium berücksichtigt die Expression der ß-NGF-Rezeptoren (Zimmermann and Sutter,1983;Rohrer and Sommer,1983) und ß-NGFs (Varon et al.,1974;Ayer-Le Lievre et al.,1984) auf den putativen Schwannschen Zellen des peripheren Nervs.So ist es möglich,daß die NGF-abhängigen Neuriten nicht direkt,sondern über die NGF-Moleküle,die mit einem NGF-Monomer an den NGF-Rezeptor der Schwannschen Zellen gebunden sind,zur Aggregation veranlaßt werden.Die beiden Möglichkeiten sind schematisch im Bild 15a und b dargestellt.

Vor allem die Kollokalisation von NGF und NGF-Rezeptoren auf Schwannschen Zellen während der Embryonalentwicklung ist neurobiologisch interessant. Die NGF-Moleküle an der Oberfläche Schwannscher Zellen könnten für die spät auswachsenden Neuriten eine Art Leitstraße ergeben oder z.B. nach Nervenläsion in der Regenerationsphase das Überleben der NGF-abhängigen Neurone bis zum Wiedereinwachsen der Neuriten in ihre Innervationsfelder fördern.Eine weitere Möglichkeit ist,daß die Koexpression von NGF und NGF-Rezeptoren das proliferative Verhalten der Schwannschen Zellen beeinflußt.In der Tat wird die Koexpression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren auf embryonalen und neoplastischen Zellen als ein Grund für deren Proliferation während der Onto- und Tumor-genese angegeben

(Todaro et al.,1978;Betsholtz et al.,1984;Sporn and Roberts,1985).Die Schwannschen Zellen sind allerdings nur eines der verschiedenen nicht-neuronalen Neuralleistenabkömmlinge, die während der Embryogenese NGF-Rezeptoren exprimieren (für die Literatur siehe End et al.,1983). So ist es interessant zu sehen,ob eine hereditäre Störung in den Regulationsgenen für ß-NGF und ß-NGF-Rezeptorexpression im adulten Organismus,bei Morbus Recklinghausen für die autonome Proliferation multipler,von der Neuralleiste abstammender Zellarten,wie Melanozyten,Schwannzellen, Mesenchymzellen (Christ et al.,1982), und chromaffinen Nebennierenmarkzellen verantwortlich ist.

Interessanterweise sind die embryonalen Nebennierenmarkzellen,obwohl sie sich zu nicht-neuronalen endokrinen Drüsenzellen entwickeln,ähnlich wie die NGF-abhängigen peripheren Neurone während der Ontogenese im Rahmen ihres Überlebens auf ß-NGF angewiesen (Aloe and Levi-Montalcini,1979).Es war deshalb nicht unerwartet,ß-NGF-Rezeptorexpression auf diesen Zellen in der Nebennierenanlage zu beobachten.Ähnlich nicht unerwartet war die diffuse und schwache Markierung der distalen kranialen sensorischen Ganglien,deren Neurone zwar plakodalen Ursprungs und nicht NGF-abhängig sind,aber deren nicht-neuronale (Glia)Zellen in vitro niedrig affine (K_D ca. 2nM) NGF-Rezeptoren enthalten (Zimmermann and Sutter,1983).

Überraschend war allerdings die frühe und starke Expression der NGF-Rezeptoren in dem parasympathischen Ganglion ciliare.Anders als in spinalen,sympathischen und proximalen kranialen sensorischen Ganglien war die Markierung nicht dauerhaft,sondern war schon kurz nach E8 nicht mehr nachweisbar.Entsprechend reagieren Ciliarganglionneurone bei E8 kaum noch auf ß-NGF in vitro und sind in ihrem Überleben in der späten Embryonalphase (der Ratte)nicht auf NGF angewiesen.Mehrere Arbeiten mit der ^{3}H-Thymidin-Kernmarkierung während der DNA-Synthese haben es gestattet,den Zeitpunkt der letzten Teilung in der Genese der Neuroblasten,der unreifen Neurone zu bestimmen.Diese Studien haben gezeigt,daß die Ciliarganglienneurone ihre DNA-Synthese vor der letzten Mitose in dem Zeitraum vom E2,5 - E5,5 durchlaufen,1-2 Tage früher als die Trigeminal- und Spinalganglienneurone (E3,5 - E7,5) (D'Amico-Martel and Noden,1980;D'Amico-Martel, 1982).Die hohe und frühe NGF-Rezeptorexpression in dem Ciliarganglion ist, wie auch die der kranialen Motoneuronen (siehe auch Seite 12) durch die offensichtlich frühere Differenzierung bedingt.

Der Nachweis der NGF-Rezeptoren in den parasympathischen Ganglien in der Frühphase der embryonalen Entwicklung ist nicht ohne klinisches Interesse. Der entwicklungsabhängige Verlust von sympathischen, sensorischen und parasympathischen Ganglienneuronen bei familiärer Dysautonomie, einer autosomal-rezessiven Erkrankung läßt einen genetischen Defekt des ß-NGF-Wirkungsmechanismus als möglich erscheinen.

Die familiäre Dysautonomie ist eine neurologische Erkrankung bei der die autonomen und sensorischen Funktionen von Geburt an gestört sind (Riley et al., 1957). Kardiovaskuläre Instabilität, Unempfindlichkeit auf Schmerz- und Temperaturreize, verspätete motorische und sprachliche Entwicklung, Unfähigkeit zu einer überschießenden Tränenflüssigkeitssekretion (z.B. bei emotioneller Belastung), und Fehlen von Geschmackspapillen sind mit die Symptome dieser Erkrankung. Neuropathologische Untersuchungen zeigten eine deutliche Verarmung an Neuronen in spinalen, sympathischen und parasympathischen Ganglien, wie auch Zeichen neuronaler Degeneration in den proximalen ("Neuralleisten"-) und distalen ("plakodalen"-) kranialen sensorischen Ganglien (Pearson and Pytel, 1978). Der einfache, autosomal-rezessive Vererbungsmodus und die hohe Prävalenz dieser Erkrankung bei Personen aschkenasischer Abstammung im Vergleich zu der Normalbevölkerung machen es wahrscheinlich, daß ein einziges mutiertes Allel an einem Genlocus für alle typischen Fälle der familiären Dysautonomie verantwortlich ist (Moses et al., 1974). Zwei Untersuchungsrichtungen haben die Aufmerksamkeit auf eine mögliche Rolle des ß-NGF-Wirkungsmechanismus in dieser Erkrankung gelenkt. Erstens wurde in zwei Arbeiten eine verringerte biologische Aktivität von ß-NGF-ähnlichen Substanzen in Fibroblastenkulturen und im Serum von Patienten mit Dysautonomie im Vergleich zu den normalen Kontrollen demonstriert (Siggers et al., 1976; Schwartz and Breakfield, 1980). Zweitens besteht eine starke, obwohl nicht komplette Übereinstimmung der neuropathologischen Veränderungen, bei Patienten mit Dysautonomie, mit denen, die durch NGF-Antikörper in utero und postnatal ausgelöst werden (Johnson et al., 1983).

Dieser klassische immunologische Abhängigkeitsnachweis der NGF-Zielzellen im fetalen Organismus unterliegt allerdings einigen Einschränkungen. So ist es für die Induktion der Immunsensorektomie bei Nagetieren notwendig, daß Antikörper gegen ß-NGF während der Embryogenese aus dem mütterlichen in den fetalen Kreislauf gelangen können. Der transamniotische und trans-

plazentare Antikörpertransfer ist ein aktiver und spezifischer Vorgang, der einen bestimmten Reifungsgrad der Trophoblasten voraussetzt. Nur Immunglobuline der Klasse IgG werden übertragen. Es ist bekannt, daß dieses Transfersystem bei den klassischen Versuchstieren zu Auslösung der Immunsensorektomie (Ratte, Meerschweinchen) erst in der zweiten Hälfte der Fetogenese einsetzt und erst kurz vor der Geburt voll ausgereift ist (Brambell, 1970).

Es ist deshalb wahrscheinlich, daß in dem Zeitraum E0-E14 bei Ratte (was etwa dem Zeitraum E0-E7 beim Huhn entspricht) der fetale ß-NGF nicht ausreichend durch die mütterlichen Antikörper blockiert wird und deshalb das Ganglion ciliare und andere parasympathische Ganglien vor der immunologisch induzierter neuronalen Degeneration während ihrer NGF-abhängigen Phase bewahrt wird. Der gleiche Mechanismus scheint auch für das Überleben der frühausreifenden peripheren sensorischen Neurone verantwortlich zu sein (Johnson et al., 1983). Da Anti-Maus-ß-NGF-Antikörper zwar mit dem Ratten und Meerschweinchen-NGF, nicht aber mit dem Huhn-NGF kreuzreagieren, besteht zur Zeit auch nicht die Möglichkeit, die Plazentaschranke zu umgehen, in dem man die Antikörper in ovo injiziert. Die Differenzen zwischen dem klinischen Bild der familiären Dysautonomie und der Immunneuronektomie beruhen wahrscheinlich auf diesen methodischen Schwierigkeiten.

Schwer erklärbar bleibt allerdings das Fehlen der Geschmackspapillen und die damit verbundene Degeneration der die Geschmackspapillen innervierenden plakodalen Neurone der distalen sensorischen Kopfganglien - Ganglion geniculatum (N.VII), Ganglion petrosum (N.IX) und Ganglion nodosum (N.X).

Zwei mögliche degenerative Abläufe während der Embryogenese sind hier zu diskutieren. Erstens kann die Degeneration primär die plakodalen Ganglienneurone betreffen, mit der sekundären Atrophie der Geschmackspapillen infolge der fehlenden neuronalen Innervation. Umgekehrt kann das Fehlen oder die Atrophie der Papillenanlagen das primäre Geschehen sein, und die neuronale Degeneration in den plakodalen Ganglien ist sekundär durch das Fehlen des peripheren Innervationsfeldes bedingt. Im Gegensatz zu den bei familiärer Dysautonomie auch betroffenen sympathischen, parasympathischen und spinalen Ganglienneuronen zeigen die plakodalen Neurone zumindest im Huhn keine NGF-Rezeptorexpression. Das könnte zwar bei H.sapiens anders sein, ist aber nicht sehr wahrscheinlich. Eine Erklärung unter der Voraussetzung des durch ß-NGF-Wirkungsmechanismus vermittelten Defekts ist aber,

daß die Geschmackspapillen selbst in der Embryogenese - entweder direkt oder indirekt NGF-abhängig sind,und im Falle des Defekts in diesem Mechanismus atrophieren,mit der Folge der sekundären Degeneration der geschmacksperzeptiven Neurone in den distalen sensorischen Ganglien.ß-NGF-Rezeptoren auf den Geschmackspapillen konnten in dieser Arbeit nicht eindeutig identifiziert werden.Es war allerdings möglich,die NGF-Rezeptorlokalisation auf einem anderen Zielorgan der plakodalen Neurone,der Innenohranlage,in den frühen Entwicklungsstadien zu demonstrieren.

Trotz der in dieser Arbeit beschriebenen,recht guten Korrelation der direkt - oder indirekt - NGF-abhängigen Zielorgane mit den multiplen Störungen bei familiärer Dysautonomie,steht die engültige Identifikation des genetischen Defekts noch aus.Inzwischen konnte mithilfe der Sequenzierung des NGF-Strukturgens ermittelt werden,daß das NGF-Gen selbst bei den Patienten mit familiärer Dysautonomie nicht defekt ist (Breakfield et al.,1984).Stattdessen wird vermutet,daß die genetische Störung auf einem Defekt in den NGF-"processing enzymes" oder z.B.in dem Strukturgen des ß-NGF-Rezeptors beruhen könnte.

Vor dem Beginn dieser Arbeit überhaupt nicht erwartet war die kräftige und entwicklungsabhängige ß-NGF-Rezeptorexpression im Muskel und in den motorischen Kerngebieten des Rückenmarks und Hirnstamms . Besonders die ^{125}I-ß-NGF-Markierung der Muskelanlagen,die mesodermalen Ursprungs sind, unterbricht das bis jetzt ausschließlich neuroektodermale Muster der ß-NGF-Rezeptorexpression.Die ^{125}I-ß-NGF-Bindungstellen auf dem Skelettmuskel und den motorischen Kerngebieten könnten auf einem Rezeptorsystem beruhen, das zwar eng verwandt,aber nicht identisch mit den NGF-Rezeptoren auf den autonomen und sensorischen Ganglienneuronen ist.Es muß aber betont werden, daß in Kompetitionsexperimenten die Bindungsaffinität für ^{125}I-ß-NGF zu Muskel und Motoneuronen sich nicht von der Bindungsaffinität zu den Spinalganglien unterschied.Der endgültige Beweis für die Identität oder Verwandschaft der Rezeptoren auf Muskel und Motoneuronen kann nur von der molekularen Analyse dieser Rezeptoren kommen.

Schon vorher wurde die NGF-Rezeptorexpression auf einem anderen Satz interagierender Zellarten gezeigt,nämlich auf den peripheren Neuronen und Gliazellen während der primären Neuroglialen Zellkontakte, die der Myelinisierung der Neurone vorausgeht (Zimmermann and Sutter,1983). In dieser Arbeit wird nun demonstriert,daß während der Entstehung der neuro-

muskulären Kontakte die NGF-Rezeptoren,auf allen drei dabei interagierenden Systemen,den sensorischen Neuronen,den Motoneuronen und der Skeltettmuskelanlage exprimiert werden.Sensorische Endigungen könnten zu der auf Muskel und Motoneuronen beobachteten ^{125}I-ß-NGF-Markierung beitragen.Sie scheinen aber nicht die einzige Ursache für die starke Markierung zu sein,und auch nicht den Hauptteil an ihr auszumachen.
^{125}I-ß-NGF-Bindung in der Position der Myotome wurde schon bei E3 beobachtet. Die ersten sensorischen Fasern erreichen das Myotom erst zwischen E3,5 - E4 (Bennet et al.,1980), und der erste retrograde axonale Transport von der in Muskel injizierten Meerrettichperoxidase wird erst bei E4,5 beobachtet (Oppenheim and Heaton,1975).Es ist unwahrscheinlich,daß die Sensitivität der autoradiographischen Methode ausreicht,um die ersten sensorischen Endigungen,die das Myotom erreichen, sichtbar zu machen. Außerdem konnte in Immunfluoreszenzstudien mit Nervensystemspezifischen monoklonalen Antikörpern zu der ausgeprägten ß-NGF-Markierung der Muskel- und Motoneuronen-gebiete nichts an der Intensität vergleichbares reproduziert werden. Stattdessen konnten in der Immunfluoreszenz nur relativ seltene, diffus verteilte und schwach fluoreszierende fleckige Strukturen im Muskel und motorischen Kerngebieten beobachtet werden, die als sensorische Nervenendigungen interpretiert wurden. Die starke ^{125}I-ß-NGF-Bindung an die motorischen Vorderwurzelfasern, die mit der Markierung des motorischen Vorderhornkerngebiete parallel geht, kann wiederum nur auf der NGF-Rezeptorexpression auf den Motoneuronen beruhen, da sensorische Axone in einer sehr geringen Anzahl in der Vorderwurzel des Rückenmarks zu finden sind.
Die NGF-Rezeptorexpression in den Motoneuronen und im Muskel während der embryologischen neuromuskulären Kontaktaufnahme und während der anschließend stattfindenden Degeneration eines Teils der Motoneurone weckt Neugierde.
Während man über die mögliche Rolle des ß-NGFs während dieser Ereignisse spekulieren kann, zeigten die bisher veröffentlichten Arbeiten, daß ß-NGF während des Zeitabschnittes der physiologischen Degeneration in den motorischen Kerngebieten (E6-E10) nicht als neurotropher Faktor funktioniert, da die Applikation von ß-NGF während dieser Phase das Überleben der Motoneurone im Gegensatz zu dem der sympathischen und sensorischen Neurone nicht fördert (Oppenheim et al.,1982).

Es wäre allerdings interessant zu erfahren,ob nicht ß-NGF eine myotrophe Wirkung besitzt beziehungsweise die Muskeldifferenzierung während der frühen Embryonalentwicklung beeinflußt.Interessanterweise scheinen die embryonalen Myoblasten bis zum E9,dem letzten Zeitpunkt der NGF-Rezeptorexpression auf Muskelanlagen nicht auf die myotrophe Wirkung der (sie innervierenden) Motoneurone angewiesen zu sein.In einer von Phillips and Bennet 1984 publizierten Arbeit wurde z.B. gezeigt,daß die Muskelentwicklung des Huhnembryos,bei dem am E2 das Rückenmark herausoperiert wurde,bis zum E9 normal verläuft,und es erst nach E9 zur Atrophie der denervierten Muskel und zum Verlust der primären Muskelfasern kommt.Es ist deshalb möglich,daß ß-NGF während der frühen Embryonalentwicklung eine myotrophe Wirkung besitzt und/oder die Muskeldifferenzierung fördert,und erst der Verlust des ß-NGF-Rezeptors die Muskel von dem myotrophen Einfluß der Motoneurone abhängig macht.Daß ß-NGF tatsächlich einen muskeldifferenzierungsfördernden Einfluß in den Entwicklungsstadien vor der Muskelinnervation entfalten kann,wurde 1978 von Radeva in Wassermolchembryos demonstriert.
Der NGF-rezeptorpositive Muskelsaum,der zeitlich vorübergehend an der Muskel-bindegewebszwischenzone erscheint,nicht aber in der bindegewebigen Umhüllung anderer Organe,wirft einige neue Fragen auf.Sein Auftreten scheint nicht die Folge des Verlustes der Muskelmarkierung zu sein,da die Muskelmarkierung bei E8 schwindet,und einige Muskel zu diesem Zeitpunkt schon NGF-rezeptornegativ sind,während ihre Umhüllung noch keine NGF-Rezeptoren exprimiert.
Stattdessen könnte die Expression von ß-NGF-Rezeptoren eher Ausdruck einer spezifischen Reifung der Nahtstelle zwischen Muskel- und Bindegewebe sein. Für diese,muskelspezifische Reifung der mesenchymalen "Saumzellen" könnten z.B.die starken,regelmäßig auftretenden Scherkräfte verantwortlich sein, die während der Muskelaktivität auf den Muskelsaum einwirken.Die bindegewebige Umhüllung anderer Organe,wie z.B. Leber und Niere bleibt während der ganzen Ontogenese unmarkiert.
Zwei Aspekte der NGF-Markierung auf dem Muskelgewebe können Anlaß für weitere Forschung auf diesem Gebiet geben.
1.Obwohl die einfachste Erklärung für die spezifische NGF-Bindung auf den Muskelanlagen die Expression der ß-NGF-Rezeptoren auf den Myoblasten ist,kann eine mögliche Beteiligung anderer Zellarten bisher nicht kategorisch ausgeschloßen werden.Zum Beispiel zeigte eine neuere Arbeit,in

der das Neuralrohr des E2 Huhnembryos durch ein gleichaltes Wachtelneuralrohr ersetzt wurde, daß die Neuralleistenzellen zur Bildung des Muskelbindegewebes beitragen (Christ et al.,1983). Es wurde über einen ähnlichen Neuralleistenbeitrag auch bei Amphibien berichtet (Rollhäuser-ter-Horst, 1975). Weiter haben Ciment and Weston 1980 beobachtet, daß zum Beispiel embryonales Extremitätenmesenchym mit Neuralleistenspezifischen monoklonalen Antikörpern reagiert.

Während die NGF-Rezeptoren auf den mesodermalen Myoblasten (Christ et al.,1982) das bis jetzt spezifisch neuroektodermale Verteilungsmuster der ß-NGF-Rezeptorexpression auf Derivate des Mesoderms erweitert, würde die Rezeptorexpression allein auf den Neuralleistenabkömmlingen in den Muskelanlagen die Spezifität dieses Verteilungsmusters zusätzlich unterstreichen. Hier wird eine ultrastrukturelle autoradiographische Untersuchung die Identifikation der NGF-rezeptortragenden Zellen in Muskelgewebe ermöglichen.

2.Durch Anwendung histologischer Routinemethoden konnten die Muskelanlagen in toto dargestellt werden; mittels der Immunfluoreszenz wurden die motorischen Kerngebiete des Vorderhorns in ihrer gesamten Ausdehnung demonstriert. Außerdem zeigte der retrograde axonale Transport der Meerrettichperoxidase aus dem Muskel in die Spinalganglien die homogene Verteilung der proprioceptiven Neurone (Honig,1982). Dagegen führte der Vergleich mit der NGF-Markierung deutlich vor Augen,daß diese nur Teile aus allen drei Systemen nachweist (siehe Tabelle I). Welche funktionelle Bedeutung diese partielle Markierung hat - ob zum Beispiel die partielle ß-NGF-Rezeptorexpression daraus resultiert, daß der Reifungsvorgang zeitlich heterogen abläuft und einige Zellen NGF-Rezeptoren noch exprimieren, während andere die NGF-Rezeptoren schon verloren haben oder ob die NGF-rezeptorpositiven und -negativen Regionen zu funktionell verschiedenen neuromuskulären Systemen heranreifen (zum Beispiel schnelle und langsame Muskulatur) werden erst weitere Studien ergeben.

ZUSAMMENFASSUNG

Autoradiographische Methoden, auf Gewebeschnitte angewandt, haben es ermöglicht, Einblick in den zeitlichen Verlauf und die genaue Lokalisation der ß-NGF-Rezeptorexpression im sich entwickelnden Huhnembryo zu gewinnen.

Rezeptoren in den klassischen NGF-Zielorganen - den sympathischen und sensorischen Ganglien und ihren zentralen und peripheren Nerven nachgewiesen.

Darüber hinaus wurde aber auch die vom Entwicklungsstadium abhängige, hochaffine, spezifische ^{125}I-ß-NGF-Bindung auf Skelettmuskel, Motoneuronen, Anlagen der Sinnesorgane und parasympathischen Ganglien demonstriert; auf Organen, von denen bisher nicht angenommen wurde, daß sie durch ß-NGF oder einen ß-NGF-ähnlichen Faktor in ihrer Entwicklung beeinflußt werden.

Diese Daten deuten darauf, daß die Rolle des Nervenwachstumsfaktors in der Entwicklung nicht nur auf seine Funktion als neurono-tropher Faktor beschränkt ist.

Die Identifikation spezifischer hochaffiner Bindungsstellen für ß-NGF sowohl im Muskel als auch in Motoneuronen könnte eine zusätzliche Sichtweise in der Erforschung der neuromuskulären Interaktion und ihres Wirkungsmechanismus eröffnen. Ebenso kann der Nachweis der NGF-Rezeptoren auf Plakodenanlagen und parasympathischen Ganglien ein Hinweis zur Aufklärung des genetischen Defekts bei der familiärer Dysautonomie sein.

Es besteht Hoffnung, daß weitere Erkenntnisse über die Regulation der Synthese des NGFs und anderer Wachtumsfaktoren und die Expression ihrer Rezeptoren neue Konzepte in der Erforschung der noch zahlreichen Rätsel der embryologischen und klinischen Neurobiologie ermöglichen werden.

L I T E R A T U R

Aloe L and Levi-Montalcini R (1979) :Nerve growth factor-induced transformation of immature chromaffin cells in vivo in sympathetic neurons:Effect of antiserum to nerve growth factor. Proc.nat.Acad.Sci.USA 76:1246-1250

Angeletti RH and Bradshaw RA (1971) :Nerve growth factor from mouse submaxillary gland:amino acid sequence. Proc.nat.Acad.Sci.USA 68:2417-2420

Ayer-Le Lievre CS,Ebendal T,Olson L,Seiger A (1984) :Localization of nerve growth factor-like immmunoreactivity in rat nervous tissue. Medical Biology 61:296-304

Bannerjee SP,Snyder SH,Cuatrecasas P,Green LA (1973) :Binding of nerve growth factor receptor in sympathetic ganglia. Proc.nat.Acad.Sci.USA 70:2519-2523

Bannerjee SP,Cuatrecasas P,Snyder SH (1976) :Solubilization of nerve growth factor receptors of rabbit superior cervical ganglia. Journal of biological Chemistry 251:5680-5685

Bennet MR,Davey DF,Übel KE (1980):The growth of segmental nerves from the brachial myotomes into the proximal muscles of the chick forelimb during development. Journal of comparative Neurology 189:335-357

Benowitz LI and Shashoua VE (1979) :Immunoreactive sites for nerve growth factor (NGF) in the goldfish brain. Brain Research 172:561-565

Betzholtz C,Westermark B,Ek B,Heldin CH (1984) :Coexpression of a PDGF-like growth factor and PDGF-receptors in a human osteoma cell line: Implications for autocrine receptor activation. Cell 39:447-457

Birkmayer W,Hornykiewicz O (1976) :Advances in Parkinsonism.Ed.Roche Basle

Boydston W,Sohal G (1980) :Role of acetylcholine receptor in neuron survival during development. Soc. Neurosci.Abst. 6:668

Bradshaw RA,Hogue-Angeletti RA,Frazier WA (1974) :Nerve growth factor and insulin:evidence of similarities in structure,function and mechanism of action. Recent Progress in Hormone Research 30:575-596

Brambell FWR:The transmission of passive immunity from mother to young. North Holland Publishing Co.Amsterdam 1970

Breakfield XO,Orloff G,Castiglione C,Coussens L,Axelrod FB,Ullrich A (1984) :Structural gene for ß-nerve growth factor not defective in familial dysautonomia. Proc.nat.Acad.Sci.USA 81:4213-4216

Bruni A,Bigon E,Boarato E,Mietto L,Leon A;Toffano G (1982) :Interaction between nerve growth factor and lysophosphatidylserine on rat perioneal mast cells. FEBS Letters 138:190-192

Bueker ED (1948) :Implantation of tumors in the hind limb field of embryonic chick and the developmental response of the lumbosacral nervous system. Anatomical Records 102:369-389

Bueker ED,Schenkein I,Bane JL (1960) :The problem of distribution of a nerve growth factor specific for spinal and sympathetic ganglia. Cancer Research 20:1220-1232

Burton LE,Wyndham HW,Shooter EM (1978) :Nerve growth factor in mouse saliva,rapid isolation procedure for and charaterization of 7S nerve growth factor. Journal of biological Chemistry 253:7807-7812

Christ B,Jacob HJ,Jacob M,Wachtler F (1983) :On tne origin,distribution and determination of avian limb mesenchymal cells. In Limb Development and Regeneration.Part B:281-291.Alan R.Liss Inc.New York

Clostrini NV,Bradshaw RA (1979) :Binding characteristics and apparent molecular size of detergent solubilized nerve growth factor receptor of sympathetic ganglia.Proc.nat.Acad.Sci.USA 76:3242-3245

Ciment G,Weston JA (1982) :Early appearance in neural crest and crest-derived cells of an antigenic determinant present in avian neurons. Developmental Biology 93:355-367

Cohen S (1960) :Purification of a nerve-growth factor promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. Proceedings of the national Academy of Sciences USA 46:302-311

Collin R (1906) :Recherches cytologiques sur le development de la cellule nerveuse. Nevraxe 8:181-308

Collins F,Dawson A (1983) :An effect of nerve growth factor on para-sympathetic neurite outgowth. Proc.nat.Acad.Sci.USA 80:2091-2094

Cowan WM (1973) :Neuronal death as a regulative mechanism in the control of cell number in the nervous system.In Rockstein (ed.):Development and aging in the nervous system.S.19-41,Academic Press,New York

D'Amico-Martel M,Noden DM (1980) :An autoradioraphic analysis of the development of the chick trigeminal ganglion. Journal of Embryology and experimental Morphology 55:167-182

D'Amico-Martel M (1982) :Temporal patterns of neurogenesis in avian cranial sensory and autonomic ganglia.

American Journal of Anatomy 163:351-372

Dupin E (1984) :Cell division in the ciliary ganglion of quail embryos in situ and after back-transplantation into the neural crest migration pathways of chick embryos. Developmental Biology 105:288-299

End D,Povzner L,LLoyd A,Guroff G (1983) :Identification of nerve growth factor receptors in primary cultures of chick neural crest cells. Developmental Brain Research 7:131-136

Fontaine-Perus J,Chanconie M,Le Douarin NM (1985) :Embryonic origin of substance P containing neurons in cranial and spinal sensory ganglia of the avian embryo. Developmental Biology 107:227-238

Frazier WA,Boyd LF,Bradshaw RA (1973) :Interaction of nerve growth factor with surface membranes:biological competence of insolubilized nerve growth factor.Proc.nat.Acad.Sci.USA 70:2931-2935

Gavin JR,ROth J,Neville DM,Buell DN (1974) :Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations - a direct demonstration in cell-culture. Proc.nat.Acad.Sci.USA 71:84-86

Gnahn H,Hefti F,Heumann R,Schwab ME,Thoenen H (1983) :NGF-mediated increase of choline acetyltransferase (ChAT) in the neonatal rat forebrain:evidence for a physiological role of NGF in the brain. Developmental Brain Research 9:45-57

Hamburger V (1952) :Development of the nervous system. Annals of the New Yorker Academy Of Sciences 55:117-132

Hamburger V,Brunso-Bechtold JK,Yip JW (1981) :Neuronal death in the spinal ganglion of the chick embryo and its reduction by nerve growth factor. Journal of Neuroscience 1:60-71

Harper GP,Barde YA,Burnstock G,Carstairs JR,Dennison ME,Suda K,Vernon CA (1979) :Guinea pig prostrate is a rich source of nerve growth factor. Nature 279:160-162

Harper GP,Glanville RW,Thoenen H (1982) The purification of nerve growth factor from bovine seminal plasma.Journal of biological Chemistry 257:8541-8548

Harris-Flanagan AE (1970) :Differentiation and degeneration in the motor horn of the foetal mouse. Journal of Morphology 129:281-306

Hauschka S,Clegg C,Lim R,Linkhart T,Chamberlain J,Jaynes J,Bulinski C, Merill D (1984) :Mitogenic regulation of the commitment of myoblasts

to terminal muscle differentiation.Journal of Embryology and experimental Morphology.Supplement 1:101

Hefti F (1983) :Is Alzheimer Disease caused by lack of nerve growth factor? Annals of Neurology 13:109-110

Herrup K,Shooter EM (1973) :Properties of ß-NGF-receptor of avian dorsal root ganglia. Proc.nat.Acad.Sci.USA 70:3884-3888

Hollyday M,Hamburger V (1976) :Reduction of naturally occuring motoneuron loss by enlargement of the periphery. Journal of comparative Neurology 170:311-320

Honegger P and Lenoir D (1982):Nerve growth factor (NGF) stimulation of cholinergic telencephalic neurons in aggregating cell cultures. Developmental Brain Research 3:229-238

Honig M (1952) :The development of sensory projection patterns in embryonic chick hind limb. Journal of Physiology 330:175-202

Hughes AF,McMillan-Carr V (1978) :The Interaction of periphery and center in the development of the dorsal root ganglia. In Jacobson M (ed.): Development of sensory systems.S.85-115 ,Springer,Berlin

Johnson EM,Gorin PD,Osborne PA,Rydel RE,Pearson J (1982) :Effects of autoimmune NGF-deprivation in the adult rabbit and offspring. Brain Research 240:131-140

Johnson EM,Osborne PA,Rydel RE,Schmidt RE,Pearson J (1983) : Characterization of the effects of autoimmune nerve growth factor deprivation in the developing guinea pig. Neuroscience 8:631-642

Kessler JA,Black JB (1980) :Nerve growth factor stimulates the development of substance P in sensory ganglia. Proc.nat.Acad.Sci.USA 77:649-652

Le Douarin NM (1982) :"The neural crest" Cambridge University Press, Cambridge

Levi-Montalcini R,Hamburger V (1951) :Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. Journal of experimental Zoology 116:321-362

Levi-Montalcini R,Booker B (1960) :Destruction of sympathetic ganglia in mammals by antiserum to nerve growth factor. Proc.nat.Acad.Sci.USA 46:384-391

Levi-Montalcini R,Angeletti PW (1968) :Nerve growth factor. Physiological Reviews 48:534-564

Lillie FR (1952) in "Lillie's development of the chick" ,3rd ed. revised

by Hamilton HL, Henry Holt & Co., New York

Luduena MA (1973) :Nerve cell differentiation in vitro Developmental Biology 33:268-284

Lumsden AGS,Davies AM (1983) :Earliest sensory fibers are guided to peripheral targets by attractants other than nerve growth factor. Nature 306:786-788

Moses SW,Rotem Y,Jagoda N,Talmos N,Eichhorn F,Levin S (1974) :A clinical, genetic and biochemical study of familial dysautonomia in Israel. Israel Journal of medical Sciences 3:358-371

Mukherjee C,Caron MG,Lefkowitz RJ (1975) :Catecholamine induced subsensitivity of adenylate cyclase associated with loss of ß-adrenergic receptor binding sites: Proc.nat.Acad.Sci.USA 72:1945-1949

Neckers LM,Cossmann J (1983) :Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T-lymphocytes is required for DNA-synthesis and cell division and is regulated by transferrin. Proc.nat.Acad.Sci.USA 80:3494-3498

Niall HD,Bradshaw RA,Bryant-Greenwood GD (1978) :Relaxin:an insulin-related growth factor. Transmemrane signaling,Progress in clinical and biological Research 31:651-658

Oppenheim RW,Heaton MB (1975) :The retrograde transport of horseradish peroxidase from the developing limb of the chick embryo.Brain Research 98:291-302

Oppenheim RW,Maderdrut JL,Wells DJ (1982) :Cell death of motoneurons in in the chick embryo spinal cord.Reduction of naturally occuring cell death in the thoracolumbar column of Terni by nerve growth factor. Journal of comparative Neurology 210:174-189

Oppenheim RW (1984) :Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord.Motoneurons prevented from dying in the embryo persist after hatching.Developmental Biology 101:35-39

Otten U,Goedert M,Mayer N,Lembeck F (1980) :Requirement of nerve growth factor for development of substance P containing neurons. Nature 287:158-159

Otten U,Goedert M,Hunt PS,Bond A,Chapman D,Schlumpf M,Lichtensteiger W (1984) :Biochemical and anatomical effects of antibodies against nerve growth factor on developing rat sensory ganglia. Proc.nat.Acad.Sci.USA 81:1580-1584

Pearson J,Pytel B (1978) :Quantitative studies of ciliary and sphenopalatine ganglia in familial dysautonomia.Journal of the Neurological Sciences 39:123-130

Perry TL,Hansen S,Kloster M (1973) :Deficiency of gamma-amino-butyric acid in brain. New England Journal of Medicine 288:337-342

Phillips WD,Bennet MR (1984) :Differentiation of fiber types in wing muscles during embryonic development:effect of neural tube removal. Developmental Biology 106:157-168

Pittman R,Oppenheim (1979) :Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord.Evidence that a functional interaction is involved in the regulation of naturally occuring cell death and the stablization of synapses. Journal of comparative Neurology 187:425-446

Radeva V (1978) :Effects of the nerve growth factor (NGF) on certain non-neuronal elements. Aggressologie 19:99-103

Richardson PM,Riopelle RJ (1984) :The retrograde transport of nerve growth factor from the central nervous system to spinal ganglion neurons. Journal of Neuroscience 4:1683-1689

Riley CM (1957) :Familial Dysautonomia. Advances in Pediatrics 9:157-190

Rohrer H,Sommer I (1983) :Simultaneous expression af neuronal and glial properties by chick ciliary ganglion cells during development. Journal of Neuroscience 3:1683-1693

Rollhäuser-Ter-Horst J (1975) :Neural crest and early forelimb development in amphibia. Anatomy and Embryology 147:337-344

Sherwin SA,Sliski AH,Todaro GH (1979) :Human melanoma cells have both nerve growth factor and nerve growth factor specific receptors on their surface. Proc.nat.Acad.Sci.USA 76:1288-1292

Soman V,Feilig P (1978) :Regulation of the glucagon receptor by physiological hyperglucagonemia. Nature 272:829-831

Sporn MG,Roberts AB (1985) :Autocrine growth factors and cancer. Nature 313:745-747

Stöckel K,Schwab ME,Thoenen H (1975) :Comparison between retrograde axonal transport of nerve growth factor and tetanus toxin in motor, sensory and adrenergic neurons. Brain Research 99:1-16

Sutter A,Riopelle RJ,Harris-Warrick RM,Shooter EM (1977) The heterogeneity of nerve growth factor receptors. Soc.Neurosci.Abstr. 3:1975

Sutter A,Riopelle RJ,Harris-Warrick RM,Shooter EM (1979) :Nerve growth

factor receptors.Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. Journal of biological Chemistry 254:5972-5982

Sutter A,Zimmermann A (1983) :Identification of subclasses of sensory ganglia cells by monoclonal antibodies. Hoppe-Seyler's Zeitschrift der physiologischen Chemie 364:1271

Szutowicz A,Frazier WA,Bradshaw RA (1976) :Subcellular localization of nerve growth factor receptors,developmental correlations in chick embryo brain. Journal of biological Chemistry 251:1524-1528

Terry RD,Davies P (1980) :Dementia of the AlzheimerType. Annual Review of Neurosciences 3:77-95

Varon S,Raiborn C,Burnham PA (1974) :Implication of a nerve growth factor-like antigen in the support derived by ganglionic neurons from their homologous glia in dissociated cultures. Neurobiology 4:317-327

Wallace LJ,Partlow LM (1976) :Alpha-adrenergic stimulation of secretion of mouse saliva rich in nerve growth factor. Proc.nat.Acad.Sci.USA 73:4210-4214

Winick M,Greenberg RE (1965) :Appearance and localization of a nerve growth promoting protein during development. Pediatrics 35:221-228

Yip HK,Johnson EM (1984) :Developing dorsal root ganglion neurons require trophic support from their central processes: evidence for a role of retrogradely transported nerve growth factor from the central nervous system to the periphery. Proc. nat.Acad. Sci.USA 81:6245-6249

Zaimis E,Berk L,Cullingham BA (1965) :Morphological,biochemical and functional changes in the sympathetic nervous system of rats treated with nerve growth factor antiserum. Nature 206:1220-1226

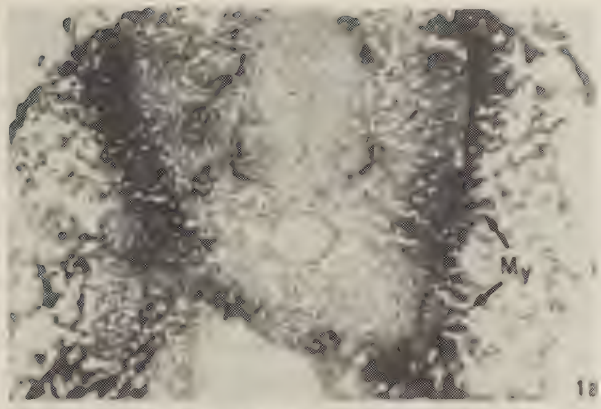
Zimmermann A,Sutter A (1983) :ß-Nerve growth factor receptors on glial cells.Cell-cell interaction between neurones and Schwann cells in cultures of chick sensory ganglia. EMBO Journal 2:879-885

Bild 1: Embryonaltag 4 (E4) :Transversalschnitte des Thorax.

a. ^{125}I-ß-NGF Autoradiographie wurde wie bei Material und Methoden beschrieben,ausgeführt. ^{125}I-ß-NGF Bindung ist besonders intensiv auf dem Myotom (My),schwächer auf den spinalen (sp) und sympathischen Ganglien (sy). (50 x).

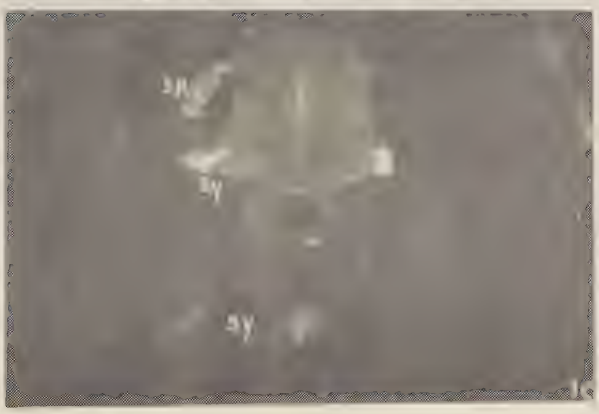
b. ^{125}I-ß-NGF Autoradiographie des benachbarten Schnittes. ^{125}I-ß-NGF Markierung wurde in Gegenwart eines 100-fachen Überschußes an unmarkiertem ß-NGF durchgeführt.(Kontrolle) (50 x).

c. SGIII-1 Immunfluoreszenzmarkierung des benachbarten Schnittes. Die sensorischen und sympathischen Ganglien sind deutlich sichtbar.SGIII-1 ist ein monoklonaler Antikörper,der die peripheren Ganglienneurone und die Gliazellen markiert. (75 x).



1a

1b



1c

Bild 2: E4. Transversalschnitte des Kopfes.

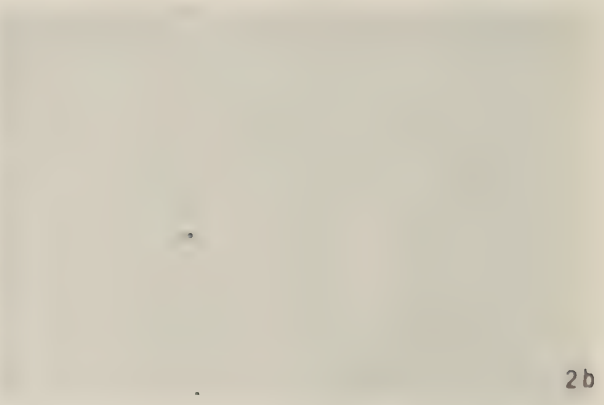
a. ^{125}I-ß-NGF Autoradiographie.Deutliche,wenn auch schwache Markierung der trigeminalen (tg) und vestibulocochlearen (vc) Ganglien und der Flügelplatte (fp) des Hirnstamms, die neuroepitheliale Zellschicht (ne) ist unmarkiert. (75 x).

b. Kontrolle (75 x)

c. Mithilfe der SGIII-1 Immunfluoreszenz können die beiden Ganglien in ihrer Ausdehnung identifiziert werden. (75 x).

d. ^{125}I-ß-NGF Autoradiographie.Starke Markierung des Nervus oculomotorius (N.III),seines motorischen Kerngebietes (nmo) und des Ganglion ciliare (ci).Die Retina (re) ist nur schwach markiert. (40 x).

or
tp
vc
tg
2a


2b

2c

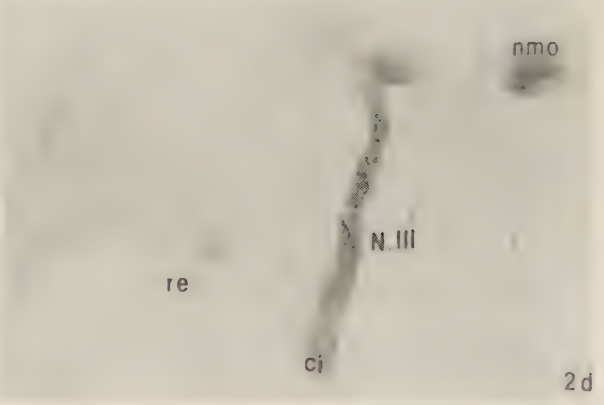

nmo
N.III
re
ci
2d

Bild 3: E4. Querschnitte durch die Innenohranlage.

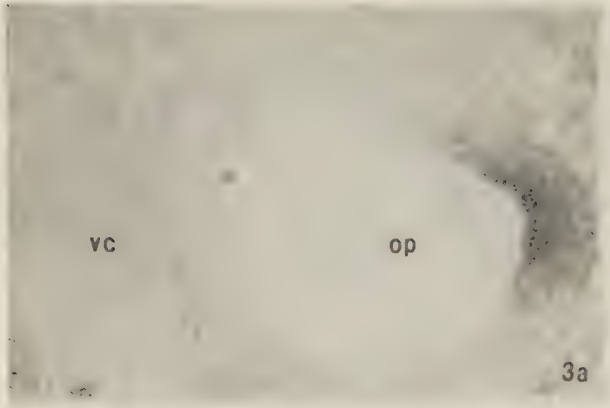
a. ^{125}I-ß-NGF Autoradiographie. Starke Markierung eines Teils der Innenohranlage (op), schwache Markierung des übrigen Innenohrepithels und des Ganglion vestibulocochleare (vc). (75 x).

b. Kontrolle. (75 x).

Bild 4: E6. Teil eines Transversalschnittes des Kopfes.

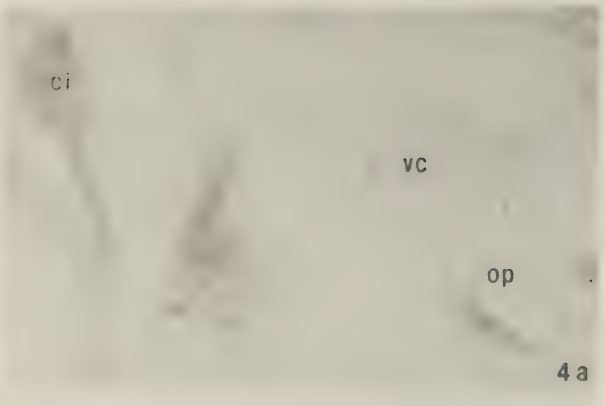
a. ^{125}I-ß-NGF Autoradiographie. Starke Markierung eines Teils der Innenohranlage (op) und des Ganglions ciliare (ci). (40 x).

b. Kontrolle. (40 x).



3a

3b



4a

4b

Bild 5: E8. Untere zervikale Rückenmarksquerschnitte.

a. ^{125}I-ß-NGF Autoradiographie.Starke Markierung der Lateralen Motorkolumne (lmk),der vorderen und hinteren Rückenmarkswurzeln,des dorsomedialen Teils (dm) des Spinalganglions und der Hinterwurzeleingangszone (ez). Schwache Markierung der Hinterstränge des Rückenmarks und des ventrolateralen (vl) Teils des Spinalganglions. (50 x).

b. Kontrolle (50 x).

c. Mithilfe der SGII-1 Immunfluoreszenz werden die Hinterwurzeleingangszonen und die Hinterstränge im Rückenmark dargestellt.Andere Teile des Rückenmarks sind unmarkiert. (75 x). SGII-1 ist ein monoklonaler Antikörper der nur die peripheren Neurone und ihre Neuriten markiert.

d. SGIII-1 Immunfluoreszenz.Die zentralen Gliazellen des Rückenmarks,werden durch diesen monoklonalen Antikörper mitmarkiert.Auffallend ist die ausbleibende Markierung der Lateralen und der Medialen Motorkolumnen. (75 x).

5a

5b

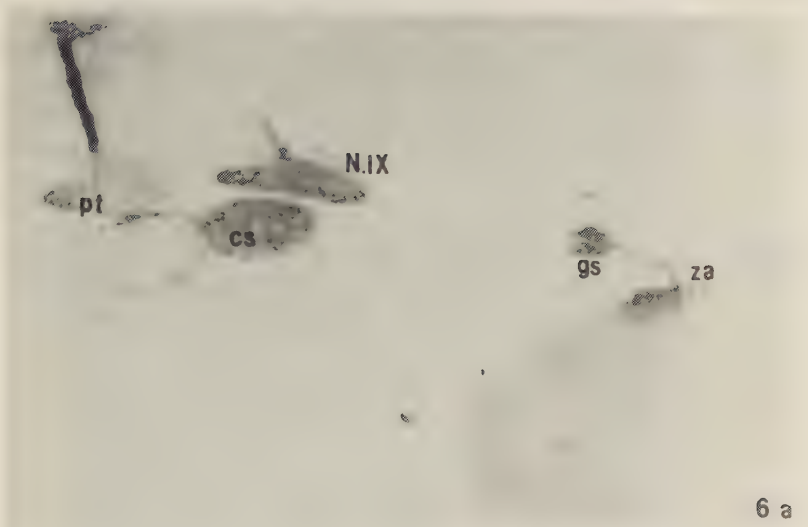
5c

5d

Bild 6: E8. Frontale Kopfschnitte in der Höhe der Medulla oblongata.

a. ^{125}I-ß-NGF Autoradiographie. Starke Markierung des proximalen sensorischen Ganglion glossopharyngeus superior (gs), des sympathischen Ganglion cervicale superior (cs) und des Nervus glossopharyngeus (N. IX). Die zentralen Axone (za) des Nervs und die Nervenfaszikel, die an der Peripherie das Ganglion petrosum durchziehen sind ebenfalls stark markiert. Das distale sensorische "plakodale" Ganglion petrosum (pt) selbst ist nur geringfügig markiert. (25 x).

b. Kontrolle. (25 x).



6 a

6 b

Bild 7: E8. Frontale Kopfschnitte in der Höhe des Metencephalons.

a. ^{125}I-ß-NGF Autoradiographie. Starke Markierung des dorsomedialen (dm-) Teils des Ganglion trigeminus, das die von der kranialen Neuralleiste abstammende sensorische Neurone enthält. Das ventrolaterale (vl-) Teil des Ganglions, dessen Neurone plakodalen Ursprungs sind, ist nur schwach markiert. (25 x).

b. Kontrolle. (25 x).

Bild 8: E8. Teil eines Transversalschnittes des oberen Abdomens. ^{125}I-ß-NGF Autoradiographie. Starke Markierung der NGF-rezeptorpositiven Zellansammlungen in der Nebennierenanlage (nn). (100 x).

7a

7b

8

Bild 9: E8. Longitudinaler Schnitt durch den Plexus brachialis. ^{125}I-ß-NGF Autoradiographie. Der Plexus brachialis (pb) ist in seiner gesamten Ausdehnung stark markiert. Ebenfalls markiert sind einige der Muskelanlagen (m) des Flügels. In der Lateralen Motorkolumne (lmk) ist die Markierung medial etwas stärker. Die Pfeilspitzen deuten auf die markierten Neuritenfaszikel der Motoneurone in der Rückenmarksvorderwurzel. (15 x).

9

Bild 10: E8. ^{125}I-ß-NGF Autoradiographie eines frontalen Ganzkörperschnittes durch das Rückenmark. Bemerkenswert ist die Größe der markierten Lateralen Motorkolumne in den Gebieten der zervikalen und lumbalen Intumeszenzen. (15 x).

Bild 11: E20. Transversalschnitte des unteren Halses.

a. ^{125}I-ß-NGF Autoradiographie.Bemerkenswert ist der Verlust der Markierung der Lateralen Motorkolumnen und der Hinterstränge und die andauernde ^{125}I-ß-NGF Bindung an die Hinterwurzeleingangszone (ez) und den Meningen (me) des Rückenmarks.(50 x).

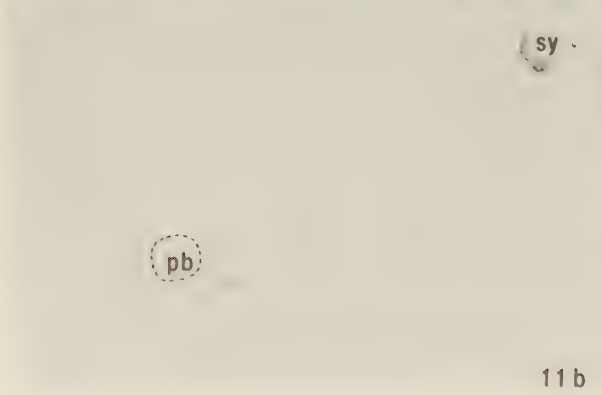
b. ^{125}I-ß-NGF Autoradiographie.Der Plexus brachialis (pb) ist unmarkiert;stark markiert ist allerdings das sympathische Ganglion (sy) des Grenzstranges. (50 x)

Bild 12: P3. Transversalschnitte in der Höhe des oberen Thorax durch die spinalen (sp) und sympathischen Ganglien.

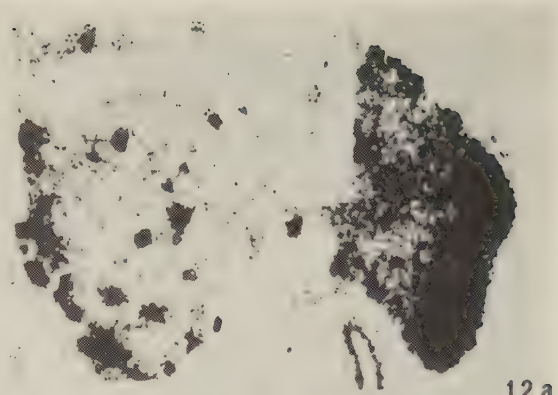
a. ^{125}I-ß-NGF Autoradiographie.Die Markierung des sensorischen Ganglions ist auf einen Teil der überwiegend dorsomedial (dm) gelegenen Neurone beschränkt.Eine homogenere und starke Markierung ist über dem sympathischen Ganglion (sy) zu beobachten. (100 x).

b. Giemsafärbung des darauffolgenden Schnittes. (100 x).

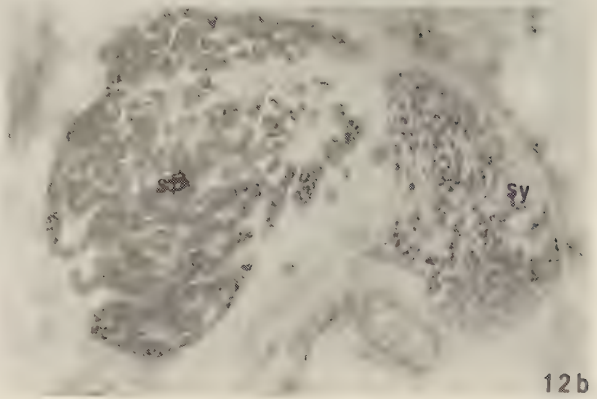
11a



11b



12a



12b

Bild 13: E8. Transversalschnitte des distalen Flügels.

a. ^{125}I-ß-NGF Autoradiographie. Bemerkenswert ist die Markierung kleiner Hautnervenäste direkt unter der Haut und größerer, gemischter Nerven die weiter innen gelegen sind. Einige der der Nerven und Nervenäste sind durch die Pfeilspitzen hervorgehoben. Von mehreren Muskeln ist nur einer deutlich markiert. (75 x).

b. Kontrolle (75 x).

13 a

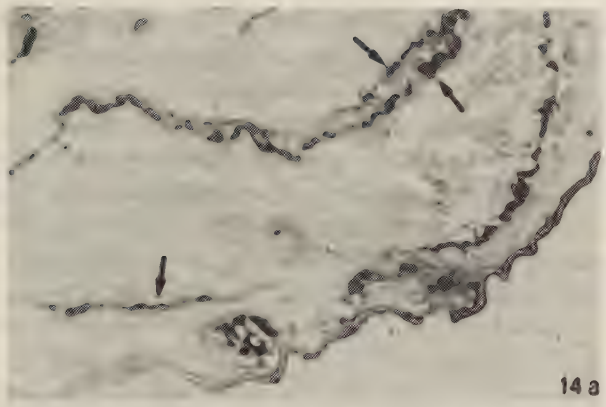
13 b

Bild 14: E15. Teil eines Transversalschnittes des distalen Flügels.

a. ^{125}I-ß-NGF Autoradiographie. Bemerkenswert ist die starke Markierung an der Muskelbindegewebszwischenzone (siehe Pfeile). (90 x).

b. Kontrolle. (90 x).

c. SGIII-1 Immunfluoreszenz der kutanen und Muskelnerven des darauffolgenden Schnittes. (90 x).



14 a

14 b

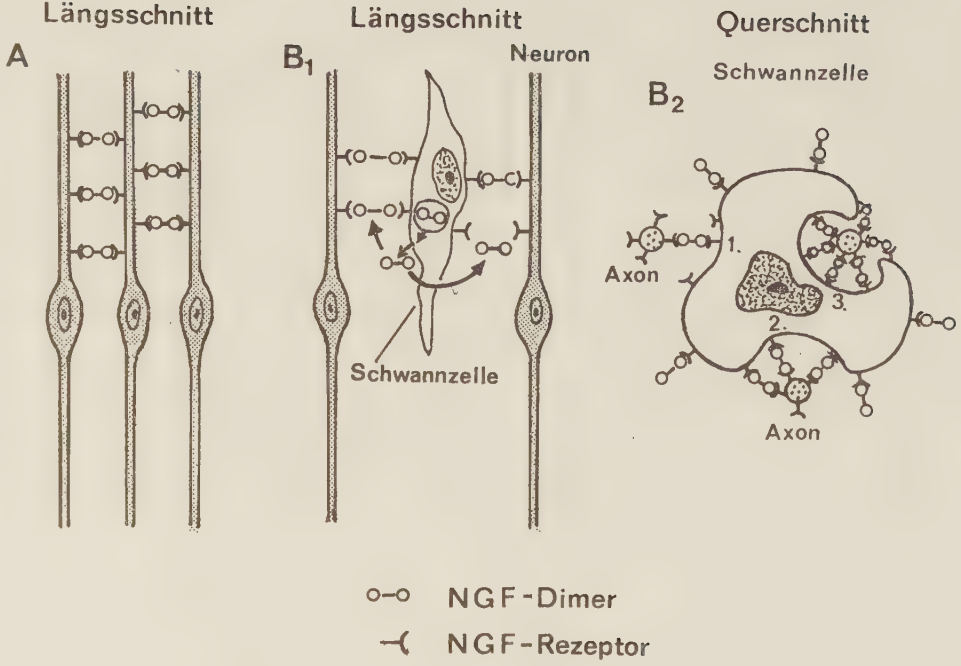
14 c

Bild 15: Eine schematische Darstellung der zwei in der Diskussion (S.20) erwähnten Erklärungsmodelle zum Wirkungsmechanismus der Aggregation NGF-rezeptorpositiver Neuriten.

A. Die Aggregation geschieht direkt über die Verknüpfung der NGF-Rezeptoren auf den neuronalen Membranen durch NGF-Dimere.

B. Die Aggregation wird durch NGF-synthetisierende Schwannsche Zellen vermittelt. Im Längsschnitt (B_1) wird schematisch eine NGF-produzierende Schwannsche Zelle gezeigt, deren Sekretgranula NGF-Dimer enthält, das nach Ausschüttung die NGF-Rezeptoren auf den Axonen mit denen dieser Schwannschen Zelle verknüpft.
Im Querschnitt (B_2) wird die mögliche Rolle dieser NGF - NGF-Rezeptorinteraktion bei den verschiedenen Stadien der axonalen Einhüllung durch die Membran der Schwannschen Zelle dargestellt.

Bild 15


Längsschnitt
A
Längsschnitt
B1
Neuron
Schwannzelle
Querschnitt
Schwannzelle
B2
Axon
1.
2.
3.
Axon
NGF-Dimer
NGF-Rezeptor

L E B E N S L A U F

Ich,Gennadij Rajwich,wurde als Sohn des Ingenieurs Shevel Rajwich und seiner Ehefrau,der Lehrerin Alwina Rajwich,geb.Wullach am 11.09.1962 in Leningrad,UdSSR geboren.

Meine Eltern haben die Sowjetunion legal verlassen und kamen am 5.1.1976 in die Bundesrepublik Deutschland.

Seit Februar 1976 wohnen wir in Berlin. Hier habe ich die gymnasiale Oberstufe an der Sophie-Scholl-Oberschule besucht und schloß im Alter von 15 Jahren meine Schulbildung mit der Abiturprüfung am 22.6.1978 ab.

Seit 1.10.1978 bin ich an der Freien Universität Berlin im Fach Humanmedizin immatrikuliert.

Nach der Physikumsprüfung im August 1980,die ich erfolgreich mit der Gesamtnote von 86.6% abgelegt habe,arbeitete ich zwei Jahre lang als Tutor für Anatomie und Neuroanatomie.

Mein Praktisches Jahr habe ich vom Oktober 1983 - August 1984 in Psychiatrie,Innere (Hämatologie) und Chirurgie absolviert.

Am 26.11.1984 habe ich den mündlichen Teil des dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung mit dem Prädikat "sehr gut" abgelegt und am 7.12.1984 die Ärztliche Approbation erhalten.

Im August 1981 fing ich mit der Arbeit an meinem Promotionsthema an.Diese Arbeit wurde auszugsweise auf dem European Developmental Biology Congress in Southampton,England und auf der Cajal Conference on Neurobiology (beides im Herbst 1984) vorgestellt;ein Teil dieser Arbeit wird außerdem im März dieses Jahres im EMBO Journal veröffentlicht.

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen